

Université de Montréal

**IDENTIFICATION D'AUTO-ANTIGÈNES ET CARACTÉRISATION
D'AUTO-ANTICORPS DANS LES HÉPATITES AUTO-IMMUNES**

Par
Oumnia Hajoui

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de PhD
En Sciences Biomédicales

Juin, 2005



W

4

U58

2006

V. 056

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures

Cette thèse intitulée :

**IDENTIFICATION D'AUTO-ANTIGÈNES ET CARACTÉRISATION
D'AUTO-ANTICORPS DANS LES HÉPATITES AUTO-IMMUNES**

Présentée par :

Oumnia Hajoui

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Marc Bilodeau
Président-rapporteur

Dr Fernando Alvarez
Directeur de recherche

Dr Idriss Djilali-Saiah
Membre du jury

Dr Abdelaziz Amrani
Examineur externe

Dr Elliott Drobetsky
Représentant du doyen de la FES

SOMMAIRE

Les auto-anticorps anti-microsomes de foie et de rein de type 1 (anti-LKM1) sont les marqueurs sérologiques de l'hépatite auto-immune (HAI) de type 2. Ces anticorps sont dirigés contre le cytochrome P450IID6 (CYP2D6). Deux types d'auto-anticorps ont été identifiés au cours de l'HAI de type 2; les premiers sont dirigés contre les épitopes linéaires et les seconds sont spécifiques aux épitopes conformationnels de la protéine CYP2D6. Ceci nous indique que les anticorps anti-LKM1 sont le résultat d'une réponse polyclonale, cette réponse induite et maintenue par l'auto-antigène CYP2D6, probablement suite à une lyse des hépatocytes. Les anticorps anti-LKM1 sont associés dans 30% des cas aux anticorps anti-cytosol (anti-LC1); Ces derniers peuvent cependant être les seuls marqueurs sérologiques chez 10% des patients atteints d'HAI de type 2. Nous avons identifié l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 par immuno-criblage d'une banque d'ADNc des cellules HepG2. Le séquençage du clone LCHC1 (*liver cytosol human clone1*) nous a permis d'identifier l'auto-antigène comme étant une enzyme hépatique, appelée la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD). Un épitope principal reconnu par tous les sérums de patients anti-LC1 positifs a été identifié. Cet épitope formé de 146 acides aminés est localisé dans la région C-terminale de la protéine. L'identification de la protéine FTCD comme l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 est une étape importante dans le développement d'un test de diagnostic additionnel pour le dépistage de l'HAI de type 2. Ce test est d'autant plus spécifique lorsque les anticorps anti-LC1 sont les seuls marqueurs sérologiques de la maladie. S'il est bien admis que les anticorps anti-LKM1 et anti-LC1 sont des marqueurs sérologiques qui permettent de caractériser un sous-groupe de patients atteints d'HAI; les auto-antigènes CYP2D6 et FTCD reconnus respectivement par les anti-LKM1 et anti-LC1 sont cependant des protéines intra-cellulaires non-exposées aux auto-anticorps circulants. La responsabilité de ces auto-anticorps dans la pathogenèse de l'HAI de type 2 reste encore à établir. En revanche, des auto-anticorps dirigés contre des protéines antigéniques de la membrane des hépatocytes peuvent, par contre, expliquer la lyse cellulaire souvent observée chez les patients atteints d'HAI. Dans ce but, nous avons isolé et purifié le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) à partir de foie humain et nous avons mis au point un test ELISA. Ce test nous a permis de détecter la présence sérologique d'auto-anticorps anti-ASGP-R chez 75% d'enfants atteints d'HAI de type 1 et 40% d'enfants atteints d'HAI de type 2. Nous avons montré que les anticorps anti-ASGP-R sont dirigés contre des épitopes conformationnels de la structure hétéro-oligomérique de la protéine mature isolée à partir de foie humain. Les chaînes de carbohydrates de la protéine sont situées dans le domaine extra-cellulaire de la membrane des hépatocytes, elles sont ainsi exposées et accessibles aux auto-anticorps circulants. Ces chaînes font partie des épitopes conformationnels. Nous pouvons conclure suite à ces résultats que les auto-anticorps anti-ASGP-R pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HAI.

Certains xénobiotiques peuvent induire un tableau clinique et biologique semblable à une HAI. Dans cette thèse, nous rapportons le cas d'une adolescence atteinte d'une hépatite induite par la minocycline. Nous avons montré dans le sérum de cette patiente la présence d'anticorps dirigés contre différentes protéines des hépatocytes en particulier les cytochromes P450. L'hépatite observée chez cette patiente pourrait être la conséquence d'une réaction immune induite par un traitement à la minocycline. Bien qu'il est possible d'envisager un mécanisme semblable à celui observé dans les cas des hépatites induites par l'acide tiénilique, la dihydralazine ou l'halothane. Le métabolite réactif responsable de cette hépatotoxicité n'a pas encore été identifié.

Mots clés : Hépatites auto-immunes. Anti-microsomes de foie et de rein de type 1. Anticorps anti-cytosol. Auto-anticorps. Auto-antigènes. Formiminotransférase cyclodésaminase. Le récepteur des asialoglycoprotéines. Sites antigéniques. Minocycline. Hépatites immuno-allergiques.

Summary

Anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1), present in sera from patients with AIH type 2 react specifically with CYP2D6. The autoimmune response against CYP2D6 is directed against linear and conformational antigenic sites. These results strengthen the argument that the LKM-1 response is polyclonal and antigen driven. These findings could be interpreted to mean that the unmodified antigen must be present within hepatocytes and is liberated after liver injury. Anti-liver cytosol type 1 autoantibodies (LC1) have been reported in association with LKM1 autoantibodies in 30% of patients with AIH type 2. In 10% of cases, LC1 antibodies are the only liver-related circulating autoantibodies. After the screening of cDNA library with anti-LC1-positive sera, we identified human liver formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) as the specific antigen recognized by LC1 antibodies. The liver cytosol human clone 1 (LCHC1) codes for a peptide of approximately 150 amino acids from the FTCD C-terminal region. All the anti-LC1-positive sera, as detected by indirect immunofluorescence and/or immunodiffusion, reacted against the LCHC1 protein by immunoblot, suggesting that this portion of the antigen contains a major linear epitope. Our current work is directed towards the development of more specific and faster diagnostic tests than those so far used for the detection of anti-LC1s. The role of LKM1 or LC1 autoantibodies in the pathogenesis of the disease is controversial, as both are directed against intracellular antigens. Liver-specific antigens exposed on the hepatocyte cell surface may play a role in the pathogenesis of AIH. The asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) is an integral membrane protein of the sinusoidal domain of the hepatocyte plasma membrane and anti-ASGP-R autoantibodies might play a role on the pathogenesis of AIH. We purified human ASGP-R from liver and used as antigen in ELISA test to detect anti-ASGP-R antibodies in the sera of patients with autoimmune hepatitis. Anti-ASGP-R antibodies were detected in 75% of children with AIH type 1 and 40% with AIH type 2. Our results show that ASGP-R antibodies in sera of patients with AIH are directed against conformational epitopes of the mature hetero-oligomeric form of the human receptor and that at least some of the epitopes are located on the extracellular domain of the antigen and are readily accessible to circulating autoantibodies. These findings lead to the speculation that anti-ASGP-R autoantibodies might play a role in the pathogenesis of AIH.

In this report we describe a case of chronic active hepatitis secondary to minocycline treatment for acne in a female adolescent. The patient's serum immunoprecipitated two proteins of 50 kDa and 90 kDa respectively, from cysteine S³⁵ labeled human hepatoma cells. Furthermore the patient's serum recognizes a 50kDa protein of rat liver microsomes when tested by western blot, and different purified P450 proteins by ELISA test. The mechanism by which an autoimmune reaction develops is not known. We speculate that there must be an antibody reaction against an as yet unknown metabolite of minocycline which cross-reacts with several microsomal cytochromes. Furthermore, this finding suggests that the mechanism of toxicity could be analogous to that described in immunoallergic reaction secondary to ingestion of halothane, tielinic acid or dihydralazine.

Key words: Autoimmune hepatitis. Liver-kidney microsome antibody type 1. Liver cytosol type 1 antibody. Autoantibodies. Autoantigens. Formiminotransferase cyclodeaminase. Asialoglycoprotein receptor. Antigenic sites. Minocycline. Immunoallergic reaction

TABLE DES MATIERES

COMPOSITION DU JURY	1
SOMMAIRE.....	2
SUMMARY.....	3
TABLE DES MATIERES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
Remerciements	11
Chapitre I: Introduction.....	12
A. Hépatite auto-immune	12
1. Pathogenèse des hépatites auto-immunes.....	13
1. Facteur génétique.....	13
2. Facteurs liés au sexe et à l'âge.....	14
3. Facteur environnemental.....	14
4. Rupture de tolérance au soi.....	15
4.1 Gène AIRE.....	16
4.2 Lymphocytes T régulateurs.....	17
4.3 Rôle des cellules dendritiques.....	17
4.4 Molécule CTLA-4.....	18
4.5 Mimétisme moléculaire.....	19
2. Auto-anticorps dans les hépatopathies auto-immunes.....	20
2.1 Auto-anticorps ANA/SMA.....	20
2.2 Auto-anticorps anti-LKM.....	21
2.3 Auto-anticorps anti-LC1.....	23
2.4 Auto-anticorps anti-SLA/anti-LP	23
2.5 Auto-anticorps anti-LM.....	24
2.6 Auto-anticorps ANCA.....	25
2.7 Auto-anticorps anti-MA.....	25
2.8 Auto-anticorps dans l'HAI associée à APECED	26
2.9 Auto-anticorps anti-ASGPR	26
B. Hépatites immuno-allergiques	30
1. Mécanisme de l'hépatite immuno-allergique	32
2. Hépatite induite par l'acide tiénilique.....	33
3. Hépatite induite par la dihydralazine	34
4. Hépatite induite par l'halothane	37
C. Objectifs de la thèse.	41

Chapitre II. Hépatite auto-immune de type 2..... 42

- A. Auto-antigène CYP2D6 reconnu par les anticorps anti-LKM1 42
1. Caractérisation de l'auto-antigène CYP2D6. 42
 2. Identification de l'auto-antigène CYP2D6 43
 3. Étude des sites antigéniques conformationnels du CYP2D6..... 48

Article 1. Conformational epitope on CYP2D6 are recognized by liver/kidney microsomal antibodies. J-C Duclos-Vallée, O Hajoui, AM Yamamoto, E Jacqz-Aigrain and F Alvarez. *Gastroenterology*. 1995; 108:470-476. 51

- B. Identification de l'auto-antigène FTCD reconnu par les anticorps anti-LC1. 74

Article 2. Formiminotransférase cyclodeaminase is an organ specific autoantigen recognized by sera of autoimmune hepatitis patients. P Lapierre, O Hajoui, J-C Homberg and F Alvarez. *Gastroenterology* 116(3):643-9, 1999..... 78

Chapitre III. Le récepteur des asialoglycoprotéines 96

- A. Fonction et structure 96
- B. Auto-anticorps dirigés contre le récepteur des asialoglycoprotéines ... 99
- C. Réponse cellulaire dirigée contre le récepteur des asialoglycoprotéines.102
- D. Détection d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum d'enfants atteints d'hépatite auto-immunes..... 105

Article 3. Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor in sera of children with autoimmune hepatitis. O Hajoui, D Debray, S Martin and F Alvarez. *Eur J Pediatr*.159(5):310-3, 2000 May..... 107

- E. Caractérisation des sites antigéniques de l'ASGP-R reconnus par les auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients atteints d'hépatites auto-immunes..... 117

Article 4. Study of antigenic sites on the asialoglycoprotein receptor recognized by autoantibodies. O Hajoui, S Martin and F Alvarez. *Clin Exp Immunol* 113(3):339-45,1998 Sep..... 121

Chapitre IV. Hépatite induite par la minocycline..... 144

Article 5. Study of immune reactivity of minocycline induced chronic active hepatitis. *Digestives Diseases and Sciences*. D. Herzog, O Hajoui, P Russo and F Alvarez. 42 (5):1100-1103,1997 May. 148

Chapitre V. Discussion Générale	159
Conclusion	172
Bibliographie	176

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau 1. Principaux auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints d' hépatopathies auto-immunes.

Tableau 2. Activation métabolique, modification covalente et antigénicité des cytochromes P450.

Chapitre II

Tableau 3. Comparaison des critères clinico-biologiques entre l'hépatite auto-immune de type 1 et type 2 chez l'enfant.

Article 1

Tableau 1. ELISA titers of LKM1-positive sera against uncoupled synthetic peptides representing CYP2D6 linear or sequential antigenic sites.

Tableau 2. Results of CYP2D6 metabolism inhibition by LKM1 sera before and after absorption with synthetic peptides representing CYP2D6 linear or sequential antigenic sites.

Tableau 3. Results of CYP2D6 metabolism inhibition by affinity-purified antibodies and rabbit sera against CYP2D6 linear or sequential antigenic sites.

Chapitre III

Tableau 4. Fréquence d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients adultes atteints d'HAI selon différentes méthodes.

Article 3

Tableau 1. Clinical and laboratory finding in ASGP-R positive and ASGP-R negative children with AIH.

Chapitre V

Table 1. Comparaison d'épitopes linéaires reconnus par les sérums de patients LKM1+/HCV- et LKM1+/HCV+.

LISTE DES FIGURES

Chapitre II

Article 1

Figure 1. Patients' sera were tested using the slot-blot technique against synthetic peptides representing linear antigenic sites before (a, c, and e) and after (b, d, and f) absorption with human liver microsomal proteins.

Figure 2. Patients' sera were tested using the slot-blot technique before (a, c, e, and g) and after (b, d, f, and h) absorption with different peptides.

Figure 3. Kinetics of dextrophan formation in human liver microsomes.

Figure 4. Inhibition of detromethorphan metabolism by different dilutions of patients' sera. (A) Patient 1, (B) patient 2, (C) patient 3, and (D) patient 4.

Article 2

Figure 1. Human hepatoma HepG2 cell line expresses the LC1 antigen.

Figure 2. Similarities between the FTCD pig sequence and the LCHC1 sequence: A) nucleotides and B) amino acid sequences.

Figure 3. FTCD is the liver-specific antigen recognized by anti-LC1s.

Figure 4. Ouchterlony double immunodiffusion method showing precipitation lines of identity between anti-LC1s and anti-pig FTCD polyclonal antibodies.

Chapitre III

Article 3

Figure 1. Correlation between ASGP-R antibody titers and serum gammaglobulin concentration.

Article 4

Figure 1. Results of ELISA tests using a purified human ASGP-R as antigen

Figure 2. SDS-PAGE analysis of purified human ASGP-R.

Figure 3. A representative result for western blot and slot blot testing of purified human ASGP-R against sera from patients with AIH.

Figure 4. Immunoprecipitation of ^{35}S -cysteine-labelled ASGP-R synthesized by HepG2 cells.

Figure 5. Immunoprecipitation of ^{125}I -labelled human ASGP-R.

Figure 6. Autoantibodies against human liver ASGP-R are able to immunoprecipitate the protein, even when the binding site of the receptor is occupied by a specific ligand.

Figure 7. Untreated or treated ^{125}I -ASGP-R was immunoprecipitated by rabbit (lanes b, c, d) or human (lanes e, f, g) antibodies.

Chapitre IV

Article 5

Figure 1. Immunoprecipitation of radiolabeled HepG2 cells with the patient's serum and four control sera, separated by SDS-PAGE and fluorography.

Chapitre V

Figure A. Similitude de séquences d'acides aminés entre l'auto-antigène CYP2D6 et les pathogènes infectieux impliqués dans l'auto-immunité hépatique. D'après Kerkar et coll, 2003. HCV: Virus C de l'hépatite, CMV: Cytomégalovirus.

Figure B : Organisation structurale du FTCD.

Figure C: Structure schématique du récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R)

LISTE DES ABREVIATIONS

ALT: Alanine aminotransferase
ADCC: Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ANA: Anti-nuclear antibody
ASGP-R: Asialoglycoprotein receptor
ASOR: Asialofoetuin
AST: Aspartate aminotransferase
CMV: Cytomegalovirus
EBV: Epstein Barr Virus
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
FTCD: Formiminotransferase cyclodeaminase
AIH: Autoimmune hepatitis
HeLa: Human, cervix carcinoma epitheloid
HepG2: Human hepatoma cell line
HCV: hepatitis C virus
HHV6 : Human herpes virus type 6
HLA: Human leukocyte antigen
IgG: Immunoglobulin G
IgM: Immunoglobulin M
kD: Kilodalton
LC1: Liver cytosol type 1 antibody
LCHC1: Liver cytosol human clone 1
LKM: Liver/kidney microsomal antibody
NS: Normal human serum
SMA: Smooth muscle antibody
AMA: Antimitochondrial antibody

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire du Service de Gastroentérologie-Hépatologie et Nutrition du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, affilié à l'Université de Montréal. J'adresse un merci tout particulier à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Je tiens à exprimer plus particulièrement ma reconnaissance envers:

Le Dr Fernando Alvarez, directeur de mon projet de doctorat qui m'a donné le goût de faire de la recherche. Je lui exprime mes sincères remerciements pour sa disponibilité, pour ses encouragements, ses critiques et ses précieux conseils.

Je remercie aussi les docteurs Steven Martin, Khazal Paradis et Emile Levy pour leur précieux conseils et encouragements. Et finalement un grand merci spécial à toute l'équipe du Laboratoire de l'Immunologie du Foie et en particulier Pascal Lapierre, Idriss Saiah, Denise Herzog.

Enfin, je remercie mon mari Jean-Pierre, mes chers enfants Sami et Leila et mon frère Azzedine, pour leurs encouragements et leur patience à mon égard.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A. Hépatite auto-immune.

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie inflammatoire du foie de cause indéterminée, responsable d'une destruction progressive du parenchyme hépatique. Elle est caractérisée histologiquement par une infiltration de cellules mononuclées au niveau du tractus portal. L'analyse sérologique montre une hypergammaglobulinémie (principalement associée à une augmentation de la fraction d'IgG chez 80% de patients) et la présence d'auto-anticorps circulants (Gregorio et coll, 1997). L'HAI peut évoluer vers une cirrhose et une insuffisance hépatique en absence de traitement (Johnson et coll, 1993; Alvarez et coll, 2001). Un traitement aux immunosuppresseurs, souvent accompagné d'effets secondaires, permet néanmoins d'obtenir la rémission du processus inflammatoire. L'HAI survient principalement chez la femme (entre 5 et 25 ans) et peut aussi se déclencher chez des enfants très jeunes (à l'âge de 6 mois) (Alvarez et coll, 2001). Un second pic d'incidence de l'HAI est observé après la ménopause (Homberg et coll, 1987). L'HAI survient souvent chez des sujets génétiquement prédisposés, porteurs d'un antigène d'histocompatibilité HLA de classe I (B8) et de classe II (DR3 et DR4) (Mackay et coll, 1980). On observe aussi une diminution du facteur C4 du complément chez les patients affectés (Scully et coll, 1993). Cette maladie est souvent associée à d'autres maladies auto-immunes extra-hépatiques chez le même patient. De plus, un antécédent de maladies auto-immunes est constaté au niveau de la fratrie dans 1 cas sur 3 (Maggiore et coll, 1993; Gregorio et coll, 1997). Toutes ces différentes caractéristiques cliniques et biologiques suggèrent que l'hépatite auto-immune est une maladie multifactorielle. Il existe deux principaux groupes

d'HAI selon le type d'auto-anticorps présents dans le sérum de patients : l'HAI de type 1 caractérisée par la présence d'anticorps anti-muscles lisses (SMA) et/ou anti-noyaux (ANA) et l'HAI de type 2 caractérisée par la présence d'auto-anticorps anti-microsomes de foie et de rein de type 1 (anti-LKM1) et/ou anti-cytosol hépatique de type 1 (anti-LC1).

1. Pathogenèse des hépatites auto-immunes

L'étiologie et la pathogénese de l'hépatite auto-immune sont encore inconnues. Toutefois, trois facteurs sont à considérer dans le développement de cette maladie 1) le facteur génétique, 2) l'âge et le sexe 3) le facteur environnemental.

1. Facteur génétique

L'HAI est une maladie rare dont l'incidence annuelle est d'environ 0.7/100 000 habitants (Czaja et coll, 1997). La recherche des gènes candidats est donc difficile. Le terrain est de nature polygénique puisqu'il n'existe pas de formes familiales. Les phénotypes HLA-DR3 et DR4 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II ont été identifiés comme des facteurs de risque de survenue de la maladie (Manns et coll, 1994). La susceptibilité de développer l'HAI de type 1 semble être associée à l'HLA-DR3 (DRB1*0301) et DR4 (DRB1*0401) chez les caucasiens de l'Europe du Nord et d'Amérique du Nord (Doherty et coll, 1994). Quant aux patients atteints d'HAI de type 2, la susceptibilité de développer la maladie est associée à l'HLA DRB1*0701 (Czaja et coll, 1997), mais les allèles B14, DR3 ont également été proposés (Manns et coll, 1994). Les patients atteints d'HAI sont affectés par d'autres maladies auto-immunes extra-hépatiques dans 20 à 40% de cas, (Gregorio et coll, 1997); comme, il n'est pas rare de trouver chez la même famille plusieurs cas de maladies auto-immunes (Ermann, et coll, 2001).

Dans une étude s'intéressant à une population de patients atteints d'HAI, l'allèle C4Q0 correspondant à la délétion du gène C4 (fraction du complément) a été mise en évidence chez 50% des sujets (Scully et coll, 1993). Des déficits en fraction C1, C2 et C4 sont également retrouvés chez les patients atteints de lupus systémique (Hartmann et coll, 1997). Il a été proposé qu'une anomalie au niveau de la cascade des protéines de complément pourrait jouer un rôle dans la pathogénie de certaines maladies auto-immunes. Un des rôles majeurs de la cascade du complément est, en effet de favoriser l'épuration des corps apoptotiques circulants provenant de la mort des cellules. Un dysfonctionnement du complément entraîne la persistance de grandes quantités de corps apoptotiques. Ces derniers étant des auto-antigènes potentiels, peuvent ensuite être présentés aux lymphocytes T et déclencher des maladies auto-immunes.

2. Facteurs liés au sexe et à l'âge

De nombreuses maladies auto-immunes montrent un biais au détriment de l'un des deux sexes en général des femmes. De la même façon, un facteur de risque très important dans la sensibilité à une HAI est le sexe du patient. Des études montrent que le ratio femme : homme est alors de 4 :1 mais et passe à 9 :1 dans le cas d'enfants atteints d'HAI de type 2 et de 7 :1 pour les enfants atteints d'HAI de type 1. L'hépatite auto-immune se présente souvent chez les enfants avant l'âge pré-pubert. D'autre part, la survenue de l'HAI de type 1 chez l'adulte peut se manifester après la ménopause (Homberg et coll, 1987).

3. Facteur environnemental.

Certains médicaments ou agents toxiques ont été impliqués dans le déclenchement d'une réponse auto-immune dirigée contre différents cytochromes P450 (CYP) exprimés dans le foie et le rein (Strassburg et coll, 2002). Les mécanismes diffèrent selon le type de toxiques (la réactivité

croisée avec un auto-antigène, la modification d'un auto-antigène). Ainsi, la présence d'auto-anticorps anti-LKM2 dirigés contre le CYP2C9 a été montrée dans le sérum de patients atteints d'hépatite induite par l'acide tiénilique (Beaune et coll, 1987). De plus, les auto-anticorps anti-microsomes (anti-LM) dirigés contre le cytochrome CYP1A2 sont présents dans le sérum de patients atteints d'hépatite induite par la dihydralazine (Strassburg et coll, 2002) et de patients atteints d'HA1 associée à l'APECED (Obermayer-Straub et coll, 2001).

Théoriquement, des agents infectieux pourraient déclencher l'apparition de manifestations auto-immunes par différents mécanismes tels que le mimétisme moléculaire avec des auto-antigènes, activation polyclonale des lymphocytes B avec activation de clones autoréactifs. On peut citer les cas du virus C de l'hépatite ou celui du virus D de l'hépatite, qui peuvent déclencher l'apparition de manifestations auto-immunes chez des patients (Criveli et coll, 1983; Lenzi et coll, 1990).

4. Rupture de la tolérance au soi.

La tolérance immunitaire au soi repose sur un mécanisme central localisé au niveau du thymus et de la moelle osseuse et sur des mécanismes périphériques. Les thymocytes subissent une double sélection fondée sur l'interaction de leur TCR (pour *T cell receptor*) avec les complexes CMH-peptide des cellules les entourant (Starr et coll, 2003). La sélection positive assure la restriction du CMH et repose sur l'interaction du TCR avec les complexes CMH-peptides des cellules épithéliales du cortex thymique. Seuls les thymocytes reconnaissant les molécules du CMH du soi reçoivent un signal de survie et poursuivent leur maturation et leur différenciation en lymphocytes T CD4+ ou CD8+ qui migreront dans la circulation périphérique et les organes lymphoïdes secondaires. La sélection négative, d'autre part, élimine les lymphocytes T auto-réactifs présentant une forte affinité pour les antigènes du soi. Elle repose sur l'interaction du TCR avec les complexes

CMH-peptide des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) de la jonction corticomédullaire du thymus, constituées par les cellules endothéliales, cellules dendritiques, macrophages, mais aussi par les cellules épithéliales médullaires. Cette tolérance centrale nécessite l'expression au niveau du thymus des antigènes du soi, soit de façon constitutive, soit importés par les cellules dendritiques (Klein et coll, 2000). Les mécanismes impliqués dans la rupture de tolérance au soi ne sont pas encore élucidés, mais une défaillance des mécanismes de control en périphérie et/ou central serait probablement impliquée.

4.1 Gène *AIRE*

Le gène *AIRE* (*pour AutoImmune REgulator*) code pour un facteur de transcription exprimé au niveau thymique, plus particulièrement par les cellules épithéliales impliquées dans la sélection négative (Pitkanen et coll, 2003). Son absence et une mutation le rendant non fonctionnel est responsable de manifestation d'auto-immunité. Ainsi, des souris rendues déficientes pour le facteur AIRE développent un syndrome d'auto-immunité associé à l'apparition de lymphocytes T auto-réactifs et d'auto-anticorps responsables de l'atteinte de nombreux organes (Anderson et coll, 2002). Chez l'homme, la mutation du gène codant pour l'AIRE est responsable du syndrome polyendocrinien de type 1. L'hépatite auto-immune peut se développer chez 10-18% de patients atteints d'APECED (Obermeyer-Straub et coll, 2001) et est probablement impliqué dans l'établissement et la maintenance de la tolérance. Le processus de sélection négative n'est cependant pas efficace à 100% et des lymphocytes T auto-réactifs sont présents dans le sang circulant chez l'homme et les animaux sains, qui ne développent pour autant pas de maladie auto-immune. L'activité de ces lymphocytes T auto-réactifs est contrôlée en périphérie par plusieurs mécanismes additionnels.

4.2 Lymphocytes T régulateurs (T reg)

Les lymphocytes CD4 exprimant de façon constitutive la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), ont été récemment impliqués dans le contrôle de l'auto-immunité (Shevach et coll, 2002). Ces lymphocytes T régulateurs (T-reg) CD4+CD25+ bloquent de façon non spécifique la prolifération et les fonctions des lymphocytes T auto-réactifs CD4+ CD25- et CD8+ par un mécanisme impliquant un contact direct (Takahashi et coll, 1998) ou par libération de cytokines inhibitrices telle l'interleukine 10 (IL-10) et le TGF- β (*Transforming growth factor*) (Annacker, et coll, 2001). Les lymphocytes Treg jouent un rôle majeur dans la prévention des maladies auto-immunes. En effet, la déplétion des Lymphocytes T reg chez les rongeurs qui ne développent pas de maladies auto-immunes conduit l'apparition d'un syndrome auto-immun touchant de nombreux organes (Sakaguchi et coll, 1995). Les lymphocytes Treg sont présents chez l'humain et représentent 5-10% des cellules CD4+ périphériques et possèdent les mêmes caractéristiques fonctionnelles que celles des rongeurs (Dieckmann et coll, 2001). Ces cellules dériveraient des lymphocytes ayant reconnu avec une faible affinité les auto-antigènes dans le thymus (Shevash et coll, 2002). Une étude récente a montré une diminution de la prolifération et du nombre des lymphocytes Treg isolés à partir du sang périphérique de patients atteints d'HAI. Toutefois, ces cellules conservent leur pouvoir supprimeur vis-à-vis des cellules CD4+CD25- productrices d'IFN γ (Longhi et coll, 2004). Chez les patients atteints d'HAI et traités aux immunosuppresseurs, les cellules Treg, dont le nombre augmente, sont capable d'inhiber la prolifération *in vitro* des cellules CD8+ et d'induire la production de IL-4 par les cellules CD8 (Longhi et coll, 2005). Ces résultats suggèrent que le traitement immunosuppresseur pourrait jouer un rôle dans la reconstitution des fonctions régulatrices des cellules T CD4+CD25+ chez les patients atteints d'HAI.

4.3 Rôle des cellules dendritiques

Pour déclencher une réponse auto-immune, l'auto-antigène doit être efficacement présenté. La meilleure cellule présentatrice d'antigène est la cellule dendritique (*Dendritic cells, DC*). Les DC sont issues de la moëlle et empruntent deux voies de différenciation, myéloïde et lymphoïde. Il existe ainsi deux populations de cellules dendritiques, DC1 et DC2, qui sont distincts par leur phénotype et leur fonction. Les cellules DC1 d'origine myéloïde induit la différenciation des cellules Th1 et sont impliquées dans l'immunité. La sous-population DC2, d'origine lymphoïde, est impliquée dans l'induction de la tolérance immunologique. Cette dernière sous-population dirige la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th2 (Steinman et coll, 1991). Il a été montré que le nombre des cellules DC2 est diminué dans le sang de patients atteints d'HAI et de cirrhose biliaire primitive. Ceci suggère qu'un défaut de fonction des cellules DC2 chez ces patients pourrait participer aux mécanismes d'auto-immunité (Hiasa et coll, 2002).

4.4 Molécule CTLA-4

Lors d'une réponse auto-immune, les lymphocytes T reconnaissent l'auto-antigène présenté par une CPA en présence d'un signal de co-stimulation. Dans le cas où ce second signal est absent, les lymphocytes T deviennent anergiques et sont alors incapables de proliférer et de sécréter des cytokines. Ce signal de co-stimulation implique l'interaction entre la molécule CD28 exprimée par les lymphocytes T et son ligand B7 (B-7-1 : CD80 ou B-7-2 : CD86) à la surface des CPA. La molécule CTLA-4 (pour *Cytotoxic T-lymphocyte-antigen 4*), homologue du CD28, peut interagir avec le ligand B7 et entraîne ainsi un signal négatif pour l'activation des cellules T (Simmonds et coll, 2005). Considérant le rôle crucial du CTLA-4 dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes T, le gène codant pour cette molécule pourrait avoir une importante implication dans les mécanismes

d'auto-immunité. Un polymorphisme génétique du CTLA-4 a été constaté chez les patients atteints d'HAI de type 1 (Djilali-Saiah et coll, 2001). Le même polymorphisme génétique a été démontré chez les patients atteints de cirrhose biliaire primitive (Agarwal et coll, 2000). Ce gène pourrait donc être considéré comme un promoteur de l'auto-immunité.

4.5 Mimétisme moléculaire:

Deux modèles de souris transgéniques et sauvages ont développé une HAI après vaccination par un ADN codant pour un néo-antigène ou par un auto-antigène chimérique.

Le premier modèle consistait à injecter un ADN circulant codant pour une nucléoprotéine (NP) du virus de la chorioméningite lymphatique. La co-administration du plasmide codant pour la NP et d'IL-12 a permis l'induction d'une réponse de type Th1 caractérisée par une production d'anticorps anti-NP de type IG2a. Des lymphocytes T cytotoxiques activés dans les organes périphériques, après immunisation à l'ADN, migrent aux régions péri-portales et lobulaires du foie. Ces lymphocytes ont également entraîné une cytolysse et une augmentation du taux des transaminases (Djilali-Saiah et coll, 2002).

Le deuxième modèle de souris sauvages développant une hépatite auto-immune de type 2 consistait à immuniser avec un ADN codant pour un auto-antigène chimérique. L'auto-antigène chimérique humain (qui renferme le site antigénique des auto-antigènes CYP2D6 et de FTCD) a été reconnu par les auto-anticorps anti-LKM1 et LC1 présents chez les patients atteints d'HAI de type 2 (Vitozzi et coll, 2002). Le plasmide injecté renferme la région N-terminale du CTLA-4 murin et la séquence codante pour l'auto-antigène chimérique. L'ADN codant pour la région extracellulaire du CTLA-4 a été introduit dans le plasmide administré pour permettre la liaison de la protéine de fusion aux récepteurs présents à la surface des CPA de la souris. Dans le foie de souris immunisé, l'examen histologique a montré une inflammation intra-lobulaire, portale et péri-portale. La plupart des lymphocytes détectés

étaient des CD4+. Toutefois, des lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes B ont également observés dans le foie. Une augmentation des concentrations d'alanine aminotransférase (ALT) a été rapportée chez 60-77% de souris après 4 et 7 mois post-injection. Ce modèle était associé à la production d'anticorps anti-LKM1 et anti-LC1 dirigés contre l'auto-antigène murin. Une corrélation entre la concentration d'ALT, d'auto-anticorps anti-LKM1 et anti-LC1 et l'activité inflammatoire a été constatée chez ces souris (Lapierre et coll, 2004). Ces deux modèles de souris transgéniques d'HAI permettent de suggérer qu'une rupture de la tolérance périphérique à un antigène hépatique peut déclencher une hépatite auto-immune sans qu'une lésion inflammatoire préalable du foie ne soit nécessaire.

2. Auto-anticorps dans les hépatopathies auto-immunes.

Plusieurs types d'auto-anticorps ont été décrits dans le sérum de patients atteints d'hépatopathies auto-immunes. Les principaux auto-anticorps sont résumés dans le tableau 1.

2.1 Auto-anticorps ANA/SMA.

Les anticorps anti-noyaux (antinuclear antibodies, ANA) et/ou anti-muscle lisse (Smooth muscle antibodies, SMA) sont les anticorps exclusivement requis pour le diagnostic de l'HAI de type 1. Les anticorps SMA sont associés à des anticorps ANA chez 70% de patients atteints d'HAI de type 1 (Maggiore et coll, 1993). Toutefois, ces anticorps SMA et ANA peuvent être les seuls marqueurs sérologiques respectivement chez 35% et 15% de patients atteints d'HAI de type 1 (Obermayer et coll, 2000; Czaja et coll, 1995). La méthode conventionnelle pour rechercher les auto-anticorps ANA est l'immunofluorescence indirecte sur des coupes de tissus (foie de rat) ou sur des lignées cellulaires (telles que la lignée HeLa ou HEp2). Les anticorps ANA représentent un groupe d'anticorps très hétérogènes; ils sont dirigés contre divers antigènes nucléaires (ADN simple et double brin, tRNA,

Cycline A, lamines A et C, centromère, histone, etc) (Tan et coll, 1988). Des titres élevés d'auto-anticorps SMA sont fréquemment détectés dans le sérum de patients atteints d'HA1 de type 1 (Odièvre et coll, 1983). Ces auto-anticorps sont dirigés contre différents constituants du cytosquelette (vimentine, actine, desmine, tropomyosine et tubuline). Les auto-anticorps ANA et/ou SMA ont également été détectés dans le sérum de patients atteints de cirrhose biliaire primitive (CBP), d'hépatites virales (Lohr et coll, 1979). Ainsi, ces auto-anticorps ne semblent pas avoir une implication clinique sur la pathogenèse de la maladie, en revanche, leur détection est d'une utilité importante pour le diagnostic de la maladie. Il est cependant important de noter que les auto-anticorps SMA dirigés contre les filaments d'actine sont spécifiques de l'HA1 de type 1, ce qui a permis de distinguer un sous-groupe de patients jeunes, porteurs d'antigènes d'histocompatibilité HLA-A1-B8-DR3 et caractérisé par un faible taux de rémission (Czaja et coll, 1996)

2.2 Auto-anticorps anti-LKM.

Les anticorps anti-microsomes de foie et de rein (*anti-liver-kidney microsomes ou anti-LKM*) peuvent être détectés en immunofluorescence indirecte sur des coupes de tissus de foie et de rein chez le rat. Il existe trois types d'anticorps anti-LKM :

- Les anticorps anti-LKM1 sont les marqueurs sérologiques de l'hépatite auto-immune de type 2. En immunofluorescence indirecte, ces anticorps donnent une fluorescence homogène sur le lobule hépatique et prédominent sur la région P3 des tubes contournés proximaux du cortex rénal (Rizzeto et coll, 1973 ; Homberg et coll, 1974). Ces anticorps peuvent être facilement distingués des auto-anticorps anti-mitochondries (antimitochondrial antibodies, AMA) qui marquent les tubules distaux et proximaux du cortex rénal. Chez les patients atteints d'HA1 de type 2, les anti-LKM1 sont dirigés contre le cytochrome CYP2D6 (ancienne nomenclature P450 2D6 ou P450

db1) (Gueguen et coll, 1988; Manns et coll, 1988). Plusieurs sites antigéniques linéaires situés sur la protéine CYP2D6 sont reconnus par les anticorps anti-LKM1 présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2 (Yamamoto et coll, 1993, Manns et coll, 1991). Cependant, la présence d'anticorps dirigés contre des sites conformationnels de la protéine CYP2D6 a également été suspectée. En dehors de l'HAI de type 2, les anticorps anti-LKM1 peuvent être présents dans le sérum chez 25% des patients atteints d'hépatite médicamenteuse induite par l'halothane (Walton et coll, 1976) et chez 5% à 10% des patients infectés par le virus C de l'hépatite (HCV) (Lenzi et coll 1990; Todros et coll, 1991). Comme dans le cas d'HAI de type 2, la protéine CYP2D6 est l'auto-antigène principal reconnu par les sérums LKM1/HCV positifs (Gueguen M et coll, 1989; Yamamoto et coll, 1993; Yamamoto et coll, 1997).

- Les anticorps anti-LKM2 sont présents dans le sérum de patients atteints d'hépatite médicamenteuse induite par l'acide tiénilique (Homberg et coll, 1984). En immunofluorescence indirecte, ces auto-anticorps donnent une fluorescence prédominante sur la région centro-lobulaire du foie et sur les régions P1 et P2 du cortex rénal de souris. Les anticorps anti-LKM2 sont dirigés contre le cytochrome CYP2C9 chez l'homme et contre le CYP2C11 chez le rat (Beaune et coll, 1987). Ces auto-anticorps inhibent l'hydroxylation de l'acide tiénilique (Lopez-Garcia et coll, 1993).

- Les anticorps anti-LKM3 ont été détectés dans le sérum chez 5 à 10% des patients atteints d'HAI de type 2 où ils sont présents seuls ou en association avec les anticorps anti-LKM1 (Strassburg et coll, 1996). Les anticorps anti-LKM3 ont été décrits aussi chez 13% de patients atteints d'hépatite chronique à virus D (Criveli et coll, 1983); Ces anticorps sont dirigés contre les membres de la sous-famille 1 de l'enzyme uridine diphosphate glucuronosyl transférase (UGT) dont le poids moléculaire est de 55 kD (Philipp et coll, 1994). On a souvent recours à une autre méthode de détection telle que le western blot ou l'ELISA en utilisant l'auto-antigène

UGT1 pour distinguer les anticorps anti-LKM de type 3 des autres LKM (Fabien et coll, 2004). Trois études ont montré la présence d'anticorps anti-LKM3 chez certains patients infectés par le virus C de l'Hépatite (HCV) (Dalekos et coll, 2002; Csepregi et coll, 2001; Bachrich et coll, 2001).

2.3 Auto-anticorps anti-LC1.

Les anticorps anti-cytosol hépatiques (*liver-cytosol type 1, LC1*) ont été décrits pour la première fois en 1988 dans le sérum de patients atteints d'hépatite auto-immune de type 2 (Martini et coll, 1988). Ces auto-anticorps sont dirigés contre une protéine de 62 kD de la fraction cytosolique de foie humain (Abuaf et coll, 1992). En immunofluorescence indirecte, les anticorps anti-LC1 marquent le cytoplasme des hépatocytes péri-portales par contre la couche hépatocellulaire autour de la veine centrale n'est pas marquée. La présence d'anticorps anti-LC1 dans le sérum est associée à celle d'anticorps anti-LKM1 chez 30% des patients atteints d'HAI de type 2 (Homborg et coll, 1987; Abuaf et coll, 1992); Les anticorps anti-LC1 peuvent être les seuls marqueurs sérologiques chez 10% de patients atteints d'HAI de type 2 (Martini et coll, 1988). Le titre d'auto-anticorps anti-LC1 semble corrélérer avec l'activité inflammatoire de la maladie (Muratori et coll, 1998).

2.4 Auto-anticorps anti-SLA/anti-LP

Les auto-anticorps anti-SLA sont dirigés contre les antigènes solubles de foie. Les auto-anticorps anti-LP sont dirigés contre les antigènes solubles de foie et de pancréas. Ces anticorps réagissent avec des protéines très solubles réparties dans plusieurs types cellulaires et dont la concentration est plus élevée dans le foie. Ils peuvent être présents seuls ou en association avec les anticorps SMA et/ou ANA dans le sérum de patients atteints d'HAI. Les anticorps anti-SLA/anti-LP ne peuvent pas être détectés par immunofluorescence sur des coupes de tissus comme dans le cas des anticorps anti-LKM; ainsi la technique d'ELISA est employée pour leur

détection. Pendant longtemps, les anticorps anti-SLA et anti-LP ont été considérés comme deux auto-anticorps distincts et dirigés contre les antigènes suivants: la cytokératine 8 et/ou 18 et la glutathione transférase (GST) (Wachter B et coll., 1990; Wesierska et coll, 1998). Deux études parallèles ont aboutis à l'identification de l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-SLA/anti-LP par immuno-criblage d'une banque d'ADNc en utilisant les sérums de patients. Il s'agit d'une protéine soluble de 50 kD appelée, *UGA supprimeur tRNA associated protein*. Ces études ont aussi montré que les auto-anticorps anti-SLA et anti-LP sont identiques et reconnaissent le même auto-antigène qui est *UGA supprimeur tRNA associated protein*. Récemment, la présence des anticorps anti-SLA/anti-LP a été détectée dans le sérum de patients pédiatriques atteints d'HAI de type 1 et 2 (Vitozzi et coll, 2002). Les anticorps anti-SLA/anti-LP sont présents dans le sérum de 10.4% des patients adultes infectés par le virus C de l'hépatite (HCV+/LKM1-) et leur fréquence augmente dans le sérum de patients HCV+/LKM1+ (27%) (Vitozzi et coll, 2004). Les anticorps anti-SLA/anti-LP sont considérés comme des auto-anticorps non-conventionnels pour diagnostiquer l'hépatite auto-immune. Ils pourraient par contre constituer des marqueurs spécifiques du processus inflammatoire dans cette maladie puisqu'une diminution de leur titre dans le sérum de patients est observée après un traitement aux corticostéroïdes (Bareres et coll, 2002).

2.5 Anticorps anti-LM

Les anticorps anti-microsomes de foie (*anti-liver microsomes, anti-LM*) colorent en immunofluorescence indirecte les coupes tissulaires de foie humain ou de rat au niveau de la région centro-lobulaire. Cet anticorps est considéré comme le marqueur sérologique d'hépatite médicamenteuse induite par la dihydralazine (Nataf et coll, 1986). L'antigène cible est le cytochrome CYP1A2 (Manns et coll, 1990; Bourdi et coll, 1990)

2.6 Anticorps ANCA

Les anticorps ANCA (*anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*) sont dirigés contre les antigènes cytoplasmiques des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. La méthode de détection des anticorps ANCA est l'immunofluorescence indirecte sur frottis des polynucléaires humains fixés à l'éthanol (Van der Woude et coll, 1985). Deux principaux aspects de fluorescence ont été démontrés : un aspect c-ANCA caractérisé par une fluorescence diffuse du cytoplasme et l'aspect p-ANCA montrant une fluorescence concentrée autour du noyau des polynucléaires. Des titres élevés d'auto-anticorps p-ANCA ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 1 (Targan et coll, 1995). Par contre, ces auto-anticorps n'ont pas été décelés jusqu'à présent dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2 (Claise et coll, 1996). Les anticorps ANCA sont dirigés contre plusieurs auto-antigènes (cathepsine G, catalase, lactoferrine, actine, etc) ce qui réduit leurs implications cliniques dans la pathogenèse de l'HAI. Ils sont surtout considérés comme des marqueurs additionnels pour le diagnostic de l'HAI de type 1 (Claise et coll, 1996).

2.7 Anticorps anti-MA.

Les anticorps anti-mitochondries (antimitochondrial antibodies, AMA) sont les marqueurs sérologiques de la cirrhose biliaire primitive (CBP) (Berg et coll, 1991). Ces auto-anticorps sont détectés en immunofluorescence indirecte sur des coupes de tissus associant le rein, le foie et l'estomac de rat. Deux auto-antigènes majeurs distincts identifiés par immuno-criblage d'une banque d'ADNc de foie sont reconnus par les anticorps anti-MA. Le poids moléculaire de ces auto-antigènes mitochondriaux peut varier selon l'organe et l'espèce utilisés pour leur préparation. Un premier auto-antigène de poids moléculaire de 70kD (dont le poids moléculaire varie entre 62-74kD) correspond à la sous unité E2 du complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) et un deuxième auto-antigène de 48kD (dont le poids moléculaire varie entre

48-52 kD) a été identifié comme la 2-oxo-acide déshydrogénase (Berg et coll, 1991).

2.8 Auto-anticorps dans l'HAI associée à APECED.

La polyendocrinopathie-candidose-dystrophie ectodermique auto-immune (ou APECED pour *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) est une maladie autosomale récessive du gène AIRE (AutoImmune Regulator). L'APECED est associée à différentes maladies auto-immunes (maladie d'Addison, l'hypoparathyroïdie, le diabète de type 1 et un dysfonctionnement des gonades). L'HAI peut se développer chez 10-18% des patients atteints d'APECED, et les sérums de ces patients présentent alors des auto-anticorps dirigés contre les cytochromes P450 (Obermayer-Straub et coll, 2001). Deux principaux types d'auto-anticorps ont été identifiés dans le sérum de patients atteints d'HAI associée à l'APECED: les auto-anticorps anti-LKM dirigés contre les cytochromes (CYP2A6, CYP1A1 et CYP2B6) et les auto-anticorps anti-LM dirigés spécifiquement contre l'auto-antigène CYP1A2 (Nat et coll, 1986; Manns, 1990; Bourdin et coll, 1990).

2.9 Anticorps anti-ASGPR

Les auto-anticorps dirigés contre le récepteur des asialoglycoprotéines (*asialoglycoprotein receptor, ASGP-R*) ont été détectés dans le sérum de 88% des patients atteints d'HAI. Le récepteur est une glycoprotéine transmembranaire exprimée sur le côté sinusoïdale de la membrane des hépatocytes. La fréquence de ces auto-anticorps ne dépasse pas 14% chez les patients atteints d'autres maladies hépatiques telles que la cirrhose biliaire primaire et l'hépatite à virus B (Treichel et coll, 1990). Le titre d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients est relié à l'activité inflammatoire de la maladie; la présence de ces anticorps dans le sérum disparaît ou le titre diminue de moitié après un traitement aux immunosuppresseurs (Treichel et coll, 1984). Ces auto-anticorps pourraient

jouer un rôle pathologique important dans l'HAI car le récepteur des asialoglycoprotéines est exprimé exclusivement dans la membrane sinusoïdale des hépatocytes. Une grande partie de la protéine est exposée sur le domaine extracellulaire; d'où elle pourrait être reconnue par les auto-anticorps circulants.

Si l'implication de ces auto-anticorps n'est pas toujours établie dans la pathogenèse des hépatopathies auto-immunes; Ils peuvent néanmoins avoir une valeur diagnostique ou pronostique : les auto-anticorps anti-AMA pour la cirrhose biliaire primitive et les anticorps SMA/ANA ou anti-LKM1/anti-LC1 pour l'hépatite auto-immune de type 1 et de type 2 respectivement.

Tableau 1: Principaux auto-anticorps présents dans le sérum des patients atteints d'hépatopathies auto-immunes.

Auto-anticorps	kD	Auto-antigènes	Maladie associée
* LKM		CYP2A6, CYP1A1, CYP2B6	Hépatite auto-immune associée à APECED
* LKM-1	50	CYP2D6	Hépatite auto-immune de type 2 Hépatite chronique à virus C Hépatite à l'halothane
* LKM-2	50	CYP2C9	Hépatite induite par l'acide tiéniliq
* LKM-3	55	UGT de famille 1&2	Hépatite chronique à virus D
		UGT de famille 1	Hépatite auto-immune de type 2
* LC1	62	FTCD	Hépatite auto-immune de type 2
* LM	52	CYP1A2	Hépatite induite par la dihydralazine Hépatite auto-immune associée à APECED
	54	CYP 2E1	Hépatite à l'halothane
	57	désulfure isomérase	Hépatite à l'halothane
	59	Carboesterase	Hépatite à l'halothane
	63	Calreticuline	Hépatite à l'halothane
	80	ERp72/GRP-78	Hépatite à l'halothane
	100	Endoplasmine	Hépatite à l'halothane
	59	?	Hépatite chronique à virus C
	70	?	Hépatite chronique à virus C
* SMA		Filament d'actine	Hépatite auto-immune de type 1
* ANA		Antigènes nucléaires	Hépatite auto-immune de type 1 Cirrhose biliaire primitive
* anti-ASGP-R	46	ASGP-R	Hépatite auto-immune de type 1 et 2
*AMA		Complexe dehydrogenase	Cirrhose biliaire primitive

Abréviations: CYP: cytochrome P450; LKM: anticorps anti-microsomes de foie et de rein; LC1: anticorps anti-cytosol de type 1; LM: anticorps anti-microsomes; SMA: anticorps anti-muscle lisse; ANA: anticorps anti-noyaux; Anti-ASGP-R: anticorps dirigés contre le récepteur des asialoglycoprotéines. UGT: uridine glycoronosyl transferase; FTCD: formiminotransférase cyclodésaminase; Anti-AMA: anticorps anti-mitochondries. APECED : *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*

B. Hépatites immuno-allergiques

L'organisme est exposé en permanence à de nombreux xénobiotiques naturels auxquels s'ajoute un nombre croissant de médicaments. Les maladies iatrogènes, en particulier les hépatites, sont devenues une cause fréquente de morbidité. Ainsi, on estime que les médicaments sont responsables de la moitié des hépatites observées chez les sujets âgés (Benhamou et coll, 1996). La forte incidence observée chez ce groupe de patients est associée à une consommation élevée de médicaments. Les médicaments peuvent entraîner presque tous les types de lésions hépatiques. Le mécanisme de ces lésions n'est pas univoque, et deux mécanismes peuvent être individualisés. Le premier fait intervenir une hépatotoxicité directe, liée au médicament lui-même ou, le plus souvent, à l'un de ses métabolites. Le second fait appel à une hépatotoxicité indirecte dont l'hépatocyte est la cible. Dans les deux cas, la formation d'un métabolite réactif semble être l'étape déterminante dans le déclenchement de l'atteinte hépatique. La fréquence élevée d'hépatotoxicité s'explique par le rôle du foie dans le métabolisme des médicaments. La plupart de ces médicaments sont liposolubles et nécessitent, afin d'être éliminés dans les urines et dans la bile, une biotransformation préalable en dérivés hydrosolubles (Zimmerman et coll, 1993). Cette transformation est réalisée au niveau du foie par deux types de réactions. Les réactions de phase I consistent en une modification structurale mineure, le plus souvent par oxydation, mais parfois par réduction, et sont catalysées par les cytochromes P450 (Zimmerman et coll, 1993). Ces réactions sont sous l'influence d'inducteurs microsomaux potentiels ou de facteurs génétiques qui conditionnent le taux des divers isoenzymes (Adlert et coll, 1994). Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison, fixant sur la molécule un groupement polaire hydrosoluble (acide glucuronique, sulfate, glutathion ou acides aminés) facilitant ainsi son excrétion (Aldert et coll, 1993). Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines; la famille des cytochromes P450 est composée de

plusieurs isoenzymes qui possèdent toutes un même centre actif (le fer de l'hème) mais qui diffèrent par la structure de leurs apoprotéines (Nebert et coll, 1991). Les cytochromes P450 sont présents dans de nombreux organes, mais le contenu total du foie en cytochrome P450 est considérablement plus grand que celui des autres organes. Le cytochrome P450 hépatique est localisé principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique. Les isoenzymes ont des affinités différentes pour les divers substrats et représentent un système polyvalent pouvant métaboliser une multitude de xénobiotiques (Beaune et coll, 1993). Ce système n'est cependant pas sans inconvénient. Ainsi, la biotransformation des médicaments par le cytochrome P450 peut aboutir à la formation des dérivés stables, mais aussi à celles des métabolites réactifs instables, électrophiles ou radicaux libres, ayant la propriété de réagir avec des macromolécules tissulaires (Guengerich et coll, 1985). La formation de métabolites réactifs par le cytochrome P450 peut ainsi aboutir à diverses lésions moléculaires entraînant en particulier des hépatites toxiques ou immuno-allergiques.

Les hépatites toxiques ont les caractéristiques suivantes: a) les lésions prédominent dans la région centro-lobulaire, où la concentration de certains cytochromes P450 est la plus élevée; b) la toxicité est dépendante de la dose du médicament administré; c) contrairement aux hépatites immuno-allergiques, elles ne s'accompagnent pas de manifestations systémiques d'hypersensibilité; et; d) en cas de réadministration involontaire, elles ne récidivent pas dans un délai plus court que celui de la première atteinte (Mallat et coll, 1990). Un cas typique d'une hépatotoxicité directe est le cas de l'acétaminophène. Outre une hépatite toxique, les métabolites réactifs peuvent induire des hépatites immuno-allergiques. Ces hépatites ont des caractéristiques suivantes: a) leur survenue est imprévisible et totalement indépendante de la dose administrée; b) la réadministration du médicament provoque une récurrence dans un délai plus court et c) elles sont fréquemment associées à des manifestations extra-

hépatiques d'hypersensibilité telles qu'une fièvre, une éruption cutanée et une hyperéosinophilie sanguine (Stricker et coll, 1992).

1. Mécanisme de l'hépatite immuno-allergique.

Les médicaments sont métabolisés par les cytochromes P450 en des métabolites réactifs (étape 1). Ces métabolites réactifs peuvent se fixer sur des protéines tissulaires ou se lier aux enzymes qui catalysent leur biotransformation (étape 2). Dans les deux cas, des protéines alkylées différentes des antigènes du soi en résultent et vont constituer des néo-antigènes (étape 3). Les néo-antigènes peuvent alors déclencher une réponse immune. Lors de l'étape 4, cette réponse peut être dirigée contre a) le métabolite réactif qui est considéré comme un haptène, b) l'enzyme catalysant la biotransformation comme c'est le cas de l'hépatite induite par l'acide tiénilique, la dihydralazine et l'halothane où il y a présence d'auto-anticorps dirigés contre CYP2C9, CYP1A 2 et CYP2E1 (respectivement ou contre c) des protéines tissulaires comme dans le cas de l'hépatite à l'halothane (tableau 2) (Robin et coll, 1997). Un mécanisme hypothétique a été proposé pour expliquer la production d'auto-anticorps dirigés contre les cytochromes CYP qui sont présents dans le sérum de patients atteints d'hépatite médicamenteuse. Pour stimuler les lymphocytes T auxiliaires, les peptides alkylés doivent être présentés par des antigènes HLA de classe II. Or, ces derniers ne sont pas exprimés à la surface des hépatocytes, mais sont exprimés sur les cellules de Kupffer. La présentation du néo-antigène se produirait lors d'un renouvellement cellulaire ou lors d'une lyse de l'hépatocyte par une toxicité directe du métabolite réactif. La reconnaissance du peptide alkylé par les lymphocytes T auxiliaires aboutirait à une expansion clonale des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes B producteurs d'anticorps. Les molécules HLA de classe I exprimées à la surface des hépatocytes pourraient présenter des peptides alkylés qui donneraient lieu à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et à la génération d'une hépatite

immuno-allergique. Ce mécanisme reste cependant encore à démontrer (Pessayre et coll, 1994).

2. Hépatite induite par l'acide tiénilique.

L'acide tiénilique est un diurétique uricosurique, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle. Le médicament a été retiré du marché américain suite à la survenue d'hépatites sévères induites par ce médicament (Zimmerman et coll, 1984). L'atteinte hépatique n'est pas dépendante de la dose et survient après un délai très variable, de quelques jours à quelques mois, après la première prise du médicament. L'histologie hépatique a révélé une nécrose centro-lobulaire avec une infiltration d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes. Chez un patient ayant reçu 4 périodes de traitement, le délai de rechute est différent après chaque exposition (3 mois, 12 jours, 3 jours et 6 heures) (Berneau et coll, 1981). Chez 60% de patients atteints d'hépatite induite par l'acide tiénilique, la présence d'anticorps anti-LKM2 est détectée (Homberg et coll, 1984). Toutes ces caractéristiques cliniques montrent que l'hépatotoxicité induite par l'acide tiénilique est de type immuno-allergique. Les auto-anticorps anti-LKM2 sont dirigés contre le cytochrome CYP2C9, qui est l'enzyme catalysant la biotransformation de l'acide tiénilique (Beaune et coll, 1987); Les auteurs sont arrivés à cette conclusion à l'aide de plusieurs arguments: les anticorps anti-LKM2 ne réagissent pas en immunoblot avec des microsomes de foie foetal humain, qui sont dépourvus de CYP2C9. De plus, les anticorps anti-LKM2 et les anticorps anti-CYP2C9 testés en immunoblot sur des microsomes de foie adulte donnent des résultats identiques. Enfin, l'hydroxylation de l'acide tiénilique par le CYP2C9 est inhibée par les anticorps anti-LKM2. Les auto-anticorps anti-LKM2 testés en immunoblot contre différents cytochromes (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 et CYP2C18), ne reconnaissent spécifiquement que le cytochrome CYP2C9 chez l'homme (Lecoeur et coll, 1994) et le cytochrome CYP2C11 chez le rat (Pons et coll, 1992). Des études ont montré la présence de sites

conformationnels reconnus par les anticorps anti-LKM2 au niveau de la protéine CYP2C9 (Lecoeur et coll, 1996).

Un mécanisme hypothétique impliqué dans l'induction d'auto-anticorps anti-LKM2 a été proposé. L'acide tiénilique est transformé par le CYP2C9 en un réactif sulfoxide, l'acide 5-hydroxy tiénilique. Ce dernier se lie de façon covalente à l'enzyme CYP2C9 ou à d'autres protéines hépatiques entraînant d'une part son inactivation enzymatique et d'autre part une alkylation de la protéine. Le rôle pathologique exact de ces auto-anticorps reste encore méconnu, puisque la topographie des cytochromes à la surface cellulaire est controversée. Certaines études ont montré que divers cytochromes P450 sont présents à la surface des hépatocytes de rat (Loeper et coll, 1990) et des hépatocytes humains (Loeper et coll, 1993). Par contre, les études de localisation du cytochrome CYP2D6 effectuées par Yamamoto et ses collaborateurs ont montré que cette protéine est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique et est absente au niveau de la membrane plasmique (Yamamoto et al, 1993). Les auto-anticorps anti-LKM2 ne sont cependant pas détectables chez 40% de patients atteints d'hépatite induite par l'acide tiénilique. Il n'est pas exclu que d'autres mécanismes puissent être responsables de cette hépatotoxicité.

3. Hépatite induite par la dihydralazine.

De nombreux cas d'hépatites médicamenteuses ont été rapportés après un traitement chronique au médicament anti-hypertensif, la dihydralazine (Stricker et coll, 1992). Ces lésions hépatiques sont caractérisées histologiquement par une nécrose centro-lobulaire accompagnée d'une activité inflammatoire et sérologiquement par une augmentation des transaminases et la présence d'auto-anticorps circulants. L'hépatite se manifeste dans ce cas après une période latente de quelques mois. Elle peut diminuer après un arrêt du traitement au médicament et une réadministration du médicament provoque chez le patient une récurrence dans un délai plus court. Toutes ces

caractéristiques montrent que l'hépatotoxicité induite par la dihydralazine est une réaction de type immuno-allergique (Van Pelt et coll, 1995); Elle est observée surtout chez les femmes (le ratio femme/homme est de 2.7/1) et chez les individus ayant un phénotype d'acétylateurs lents (Siegmud et coll, 1985). L'acétylation est la liaison à un groupe acétyl d'une substance étrangère à l'organisme. C'est un des processus par lesquels les substances nocives dans l'organisme sont transformées en substances pouvant être éliminées. Chez les personnes qu'on appelle acétylateurs lents, l'enzyme responsable de l'acétylation est moins active que chez les acétylateurs rapides.

Dans le sérum de patients atteints d'hépatite induite par la dihydralazine, il y a présence d'anticorps anti-microsomes de foie (anti-LM) (Nataf et coll, 1986). Ces anticorps colorent en immunofluorescence les coupes tissulaires de foie humain ou de rat et non le tissu rénal; on les appelle ainsi anticorps anti-liver microsomes (anti-LM) et ils sont distincts des auto-anticorps LKM1 (marqueurs spécifiques des HAI de type 2) et LKM2 (marqueurs spécifiques de l'hépatite induite par l'acide tiénilique). Chez les patients atteints d'hépatite induite par la dihydralazine, les auto-anticorps anti-LM reconnaissent en immunoblot une protéine de 53 kD de la fraction microsomale de foie humain. L'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LM a été identifié au niveau de préparations purifiées de cytochrome P450 humains et correspond au cytochrome CYP1A2 (Bourdi et coll, 1990). Malgré la grande homologie de séquence entre CYP 1A2 et CYP1A1, cette dernière n'est pas reconnue par les anticorps anti-LM (Bourdi et coll, 1992). Les anti-LM ne reconnaissent ni d'autres cytochromes (tels CYP2C8/9/10 et CYP3A4) ni l'enzyme époxyde hydrolase (Bourdi et coll, 1990).

Plusieurs métabolites de la dihydralazine ont été identifiés dans les urines et le sérum (Beaune et coll, 1994). Toutefois, le métabolisme de la dihydralazine n'est pas complètement élucidé. Deux grandes voies ont été identifiées : une voie réductrice dépendante de l'activité de la N-acétyltransférase qui permet la

formation d'un conjugué acétylé et une voie oxydative probablement catalysée par CYP1A2 (Bourdi et coll, 1994). Cette voie permet la formation d'un réactif intermédiaire qui se lie soit aux protéines tissulaires, soit au cytochrome CYP1A2, ou subit une biotransformation en hydralazine (Van Pelt et coll, 1995). Bourdi et ses collaborateurs ont montré qu'un réactif intermédiaire issu de la transformation de la dihydralazine se lie à l'enzyme CYP2A1 qui le produit. Cette liaison covalente est spécifiquement inhibée par les auto-anticorps anti-LM et anti-CYP1A2. Le glutathion diminue de 50 fois la formation du conjugué (CYP 1A2-métabolite réactif). La présence du N-acétyl Coenzyme A ou de N-acétyltransférase permet aussi une réduction de cette liaison. Ceci a permis de montrer que l'acétylation est une voie détoxifiante (Bourdi et coll, 1994). Une augmentation de l'activité enzymatique du CYP1A2 a été observée chez des rats traités *in vivo* avec de la dihydralazine (Bourdi et coll, 1992). Ce même résultat a été observé dans les hépatocytes humains traités *in vitro* par la dihydralazine. Ce traitement n'affecte pas d'autres isoenzymes. Ainsi un traitement chronique à la dihydralazine entraîne une induction du cytochrome CYP1A2, l'enzyme qui métabolise la dihydralazine et qui est la cible des anticorps anti-LM. Il a été suggéré que cette réponse puisse être un événement critique pour l'initiation de l'hépatite médicamenteuse induite par la dihydralazine.

Les études effectuées jusqu'à présent suggèrent que le mécanisme permettant l'induction d'auto-anticorps anti-LM est similaire à celui impliqué dans le développement d'auto-anticorps anti-LKM2. Le métabolisme oxydatif induit la formation d'un réactif intermédiaire qui se lie au CYP1A2 alors que l'acétylation empêche cette liaison. Une variabilité inter-individuelle concernant le CYP1A2 et l'activité acétyltransférase a été rapportée. Ce qui peut expliquer la susceptibilité de l'hépatite induite par la dihydralazine chez les individus à phénotype acétylateurs lents (Sigmud et coll, 1985). L'activité de la N-acétyltransférase est absente chez 50% de la population caucasienne, résultant en un phénotype acétylateur lent (Bock et coll, 1986). Ces derniers ne

peuvent alors utiliser que la voie oxydative catalysée par le cytochrome CYP1A2 pour la biotransformation de la dihydralazine. Les caractéristiques cliniques de l'hépatite induite par la dihydralazine, d'une part, et la présence d'auto-anticorps, d'autre part, montrent le rôle du système immunitaire dans l'induction de cette pathologie. Les anticorps anti-LM dirigés contre le CYP1A 2 sont de plus présents chez tous les patients atteints d'hépatite induite par la dihydralazine. Le titre de ces auto-anticorps est élevé durant la maladie et diminue, voire même disparaît complètement, après un arrêt du traitement à la dihydralazine (Bourdi et coll, 1990). Bien que les auto-anticorps anti-LM soient spécifiques de l'hépatite induite par la dihydralazine, leur rôle dans l'induction de la pathologie n'est cependant pas encore établi. La présence de l'auto-antigène (CYP1A2) à la surface cellulaire est également controversée.

4. Hépatite induite par l'halothane.

Il existe deux types d'hépatite induite par l'halothane: une mineure très fréquente (30% des cas) dont le mécanisme est lié à une hépatotoxicité directe de métabolites réactifs de l'halothane (Kenna et coll, 1995), et une hépatite sévère souvent fulminante observée chez environ 1 sur 35.000 patients après une anesthésie par l'halothane avec un taux de plus de 75% de mortalité (Coussins et coll, 1989; Ray et coll, 1991). Cette hépatite est souvent observée suite à des expositions répétées à l'halothane. Elle est caractérisée par une éosinophilie, une augmentation des transaminases et des complexes immuns sériques et histologiquement par une nécrose hépatique intense. Cette forme sévère est désignée par le terme "l'hépatite à l'halothane". La présence de manifestations d'hypersensibilité tels que la fièvre, l'éruption maculaire et l'éosinophilie associées à la variété d'auto-anticorps circulants dans le sérum de patients, montre que cette hépatite à l'halothane est d'origine immuno-allergique (Zimmerman et coll, 1978).

L'halothane est métabolisé par les cytochromes P450 en une variété de métabolites réactifs qui se lient aux macromolécules hépatiques (Kenna et

coll, 1994). Deux voies métaboliques ont été décrites. La première est une voie réductrice permettant la formation d'un radical réactif, ce dernier pouvant se lier aux macromolécules tissulaires et/ou déclencher la peroxydation lipidique, et étant ainsi responsable de l'hépatotoxicité directe de l'halothane (Knights et coll, 1987). La deuxième voie métabolique majeure oxydative permet la formation d'un intermédiaire réactif, le chlorure trifluoroacétylé. Ce réactif peut se lier aux résidus lysines des protéines et former un acide trifluoroacétique (TFA) (Sipes et coll, 1980), qui peut réagir comme un néo-antigène et déclencher une réponse immune. Vergani et coll (1980) ont mis en évidence l'existence d'anticorps dirigés contre un néo-antigène hépatocytaire dans le sérum de patients atteints d'hépatites à l'halothane. Le sérum des patients et des sujets normaux était préalablement absorbé par les hépatocytes normaux, puis utilisé dans deux tests: a) en immunofluorescence indirecte, les anticorps présents dans le sérum de 7 patients sur 11 se fixent sur les hépatocytes en culture : ces anticorps étaient bien dirigés contre un antigène membranaire, b) dans un test de microcytotoxicité, les anticorps présents dans le sérum de 9 patients sur 11 étaient hépatotoxiques. Ces données suggèrent que la réponse immunitaire est responsable de ces lésions (Vergani et coll, 1980). Une autre étude a montré que le néo-antigène est présent au niveau du réticulum endoplasmique avant d'apparaître à la surface cellulaire. La fraction microsomale a été isolée à partir du foie d'un lapin anesthésié à l'halothane et utilisée comme auto-antigène pour rechercher des anticorps spécifiques dans les sérums de patients atteints d'hépatite à l'halothane. Les sérums de ces patients ont été préalablement absorbés par des microsomes de foie normal. En test ELISA, 67% de ces patients présentaient des anticorps dirigés contre le néo-antigène spécifique (Kenna et coll, 1988). Satoh et coll (1985) ont étudié le néo-antigène en cause lors d'une hépatite à l'halothane. Les auteurs ont démontré la fixation d'anticorps anti-acide-trifluoroacétique (AC-TFA) sur des hépatocytes isolés à partir de foies de rats anesthésiés à l'halothane. Ces anticorps se fixaient spécifiquement sur la

membrane des hépatocytes traitées à l'halothane et de préférence au niveau des hépatocytes centro-lobulaires. De plus, la fixation de l'anticorps est inhibée par l'antigène ou lorsque l'halothane utilisé comportait du deutérium à la place de l'atome d'hydrogène (ce qui inhibe le métabolisme oxydatif de l'halothane et l'apparition du TFA) (Sipes et coll, 1980). Le TFA est le principal métabolite qui apparaît au cours du métabolisme oxydatif de l'halothane; il est vraisemblablement l'un des néo-antigènes cibles. Par ailleurs, il a été montré en utilisant l'anticorps anti-TFA sur une préparation de microsomes et/ou de membranes d'hépatocytes selon la technique d'immunoblot, que l'antigène cible pourrait être le couple cytochrome P450-TFA (Satoh et coll, 1985). Or le cytochrome CYP2E1 est l'enzyme catalysant la formation du conjugué TFA-protéine. Le réactif TFA pourrait donc se lier au CYP2E1 (Eliasson et coll, 1996). En outre, des métabolites réactifs peuvent quitter le site actif du cytochrome P450 et former des conjugués TFA-protéines. Ces conjugués incluent la protéine isomérase disulfure, une protéine non identifiée de 58kD, la calréticuline, Erp72, la protéine de stress BiP/GRP78 et GRP94 (Butler et coll, 1992; Davila et coll, 1992; Kenna et coll, 1990; Pumford et coll, 1993, Satoh et coll, 1989 et Thomassen et coll, 1989). Les antigènes induits lors d'une hépatite à l'halothane comprennent deux groupes distincts: un premier groupe a été identifié en utilisant la technique d'immunoblot et correspond à un groupe de polypeptides trifluoroacetylés ayant un poids moléculaire entre 100 à 54 kD en conditions dénaturantes (Kenna et coll, 1987; Kenna et coll, 1988a et Kenna et coll, 1988b). Un second groupe a été identifié par la technique ELISA et nécessite une structure conformationnelle pour être reconnu par les auto-anticorps (Knight et coll, 1994).

Tableau 2. Activation métabolique, modification covalente et antigénicité des cytochromes P450 (d'après Robin et coll, 1997).

<p>Acide tiénilique</p> <p>↓ CYP2C9</p> <p>Métabolite réactif</p> <p>↓</p> <p>Métabolite+CYP2C9</p> <p>↓</p> <p>Auto-anticorps anti-LKM2</p>	<p>Dihydralazine</p> <p>↓ CYP1A2</p> <p>Métabolite réactif</p> <p>↓</p> <p>Métabolite+CYP 1A2</p> <p>↓</p> <p>Auto-anticorps anti-LM</p>	<p>Halothane</p> <p>↓ CYP2E1</p> <p>Métabolite réactif</p> <p>↓</p> <p>Métabolite+CYP2E1</p> <p>↓</p> <p>Auto-anticorps Anti-CYP2E1</p>
--	--	---

C. Objectifs de la thèse :

Tenant compte des résultats obtenus dans notre laboratoire et des données bibliographiques, nous nous sommes intéressés aux voies de recherche suivantes :

- 1) Localisation d'épitopes linéaires sur l'auto-antigène CYP2D6 dans sa forme native et la recherche éventuelle d'épitopes conformationnels sur la protéine CYP2D6 reconnus par les auto-anticorps anti-LKM1 présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2.
- 2) Identification de l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-cytosol présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2.
- 3) Détection d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) dans le sérum d'enfants atteints d'HAI.
- 4) Caractérisation des sites antigéniques sur l'auto-antigène ASGP-R reconnus par les anticorps anti-ASGP-R présents dans le sérum de patients atteints d'HAI.
- 5) Recherche d'auto-anticorps sériques dirigés contre les protéines hépatiques chez une adolescente atteinte d'hépatite induite par la minocycline.

Chapitre II

Hépatite auto-immune de type 2

Les hépatites auto-immunes chez l'enfant sont classées en deux types selon les auto-anticorps présents dans le sérum de patients. L'HAI de type 1 est définie par la présence d'anticorps SMA (anti-F-actine) et/ou ANA et l'HAI de type 2 est caractérisée par la présence d'anticorps anti-LKM1 (Maggiore et coll, 1986). La présence d'anticorps anti-LKM1 est également associée à celle des anticorps anti-LC1 chez 30% de patients atteints d'HAI de type 2 (Abuaf et coll, 1992). L'HAI de type 2 affecte surtout les enfants ou les adolescents avec une prédominance féminine particulièrement marquée (9 pour 1). Elle est souvent associée à d'autres manifestations extra-hépatiques telles qu'un diabète insulino-dépendant, une thyroïdite ou un vitiligo (Hodges et coll, 1991). Cette forme d'HAI progresse de façon rapide, de 6 mois à 3 ans, dans 82% des cas (Homberg et coll, 1987). Certains signes biologiques diffèrent entre l'HAI de type 1 et 2, en particulier une hypergammaglobulinémie moins importante dans le cas de l'HAI de type 2. De plus, l'âge moyen des enfants atteints d'HAI de type 2 est significativement inférieur à celui des enfants atteints d'HAI de type 1 (7.4 ans versus 10.5 ans) (Gregorio et coll, 1997; Maggiore et coll, 1993) (tableau 3).

A. Auto-antigènes CYP2D6 reconnu par les anticorps anti-LKM1

1. Caractérisation de l'auto-antigène CYP2D6

En immunofluorescence indirecte, les anticorps anti-LKM1 qui sont les marqueurs sérologiques de l'HAI de type 2, se fixent spécifiquement dans le cytoplasme des hépatocytes et des cellules des tubules proximaux du cortex

rénal. La fluorescence sur coupes de foie disparaît quand le sérum du patient est pré-incubé avec la fraction microsomale de foie de rat (Rizzetto et coll, 1973). Ce résultat a permis d'indiquer la localisation tissulaire et intracellulaire de l'antigène cible et de définir un groupe particulier d'HAI chez l'enfant (Odièvre et coll, 1983). Les premières études sur l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LKM1 ont eu comme objectifs sa localisation et sa caractérisation biochimique. L'immunofluorescence sur des coupes d'organe de rat a montré que l'auto-antigène est surtout présent en forte quantité dans le foie; il est également présent dans le rein, les testicules, l'œsophage, le duodénum, le colon et les bronches (Homberg et coll, 1984). La plupart des sérums de patients porteurs d'anticorps anti-LKM1 reconnaissent en immunoblot une protéine de 50 kD sur microsomes de foie de rat (Alvarez et coll, 1985; Codoner-Franch et coll, 1989) et de 48 kD sur microsomes de foie humain (Waxman et coll, 1988). Cette protéine est non glycosylée et est présente en forte concentration dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) lisse, ou elle est exposée du côté cytoplasmique (Alvarez et coll, 1985). Ces caractéristiques sont très voisines de celles des cytochromes P450 qui constituent une famille d'isoenzymes à activité monooxydase. En utilisant la fraction microsomale de foie de rat, un test d'ELISA a été mis au point pour détecter la présence d'auto-anticorps anti-LKM1 dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2. Ces anticorps sont d'isotype IgG1 et jamais de type IgM ou IgA (Paradis et coll, 1988). Par ailleurs, il a été montré que les anticorps anti-LKM1 réagissent de façon croisée avec deux autres formes de cytochromes P450 de rat, qui sont les isoenzymes 1A1 et 1A2 induits par le méthylcholantrène (Waxman et coll, 1988). Cette réaction disparaît quand la protéine est dénaturée.

2. Identification de l'auto-antigène CYP2D6.

L'identification de l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LKM1 s'est déroulée en plusieurs étapes; tout d'abord, l'auto-antigène a été

identifié chez le rat par criblage d'une banque d'expression d'ADN complémentaire (ADNc) de foie de rat en utilisant les anticorps anti-50 kD purifiés. Ces anticorps anti-50 kD ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne d'Affi-gel couplée à la fraction microsomale de foie de rat à partir de sérums de patients positifs pour l'anticorps anti-LKM1. Le criblage de la banque d'ADNc de foie de rat a permis d'isoler 4 clones immuno-positifs. La protéine recombinante des clones immuno-positifs a été testée pour sa réactivité croisée avec la protéine microsomale de 50 kD de foie de rat. Les résultats ont montré que : a) les sérums de patients anti-LKM1 positifs purifiés par affinité sur la protéine recombinante reconnaissent en immunoblot une protéine de 50 kD de la fraction microsomale de foie de rat; b) le sérum de lapin immunisé avec la protéine recombinante reconnaît une protéine de 50 kD dans les mêmes conditions et c) tous les sérums de patients atteints d'HAI type 2 et qui présentent des anticorps anti-LKM1, reconnaissent la protéine recombinante. Les cartes de restriction et le séquençage partiel de l'ADNc ont été effectués sur les 4 clones obtenus. La comparaison de ces séquences avec la banque de données a montré une homologie complète entre les formes IID1 et IID2 des cytochromes P450 de la sous famille IID de rat et l'ADNc des clones spécifiquement reconnus par les auto-anticorps anti-LKM1. Il a été ainsi conclu que les auto-antigènes cibles reconnus par les anticorps anti-LKM1 sont le cytochrome P450 IID1 et IID2 de rat appartenant à la sous-famille IID (Gueguen et coll, 1988). La grande homologie (71% en acides aminés) entre les cytochromes P450 IID1 et IID2 de rat et le cytochrome P450 IID6 humain (ou CYP2D6 selon la nouvelle nomenclature) laissait suggérer que l'auto-antigène humain reconnu par les anticorps anti-LKM1 pourrait être le cytochrome CYP2D6. Deux approches indépendantes ont été effectuées pour identifier l'auto-antigène de foie humain.

La première approche utilise le criblage d'une banque d'ADNc de foie humain et l'identification du cytochrome CYP2D6 par analyse de séquence (Manns et

coll, 1989; Gueguen et coll, 1989). L'ADNc de P450 II de rat isolé a été utilisé comme sonde pour rechercher son homologue humain dans une banque d'ADNc de foie humain inséré dans le phage λ gt-11. Le clone isolé à partir du criblage de la banque de foie humain a été sous-cloné dans un vecteur d'expression pGEM-2 et la protéine de fusion a été produite à partir de ce clone. La carte de restriction du clone obtenu a montré qu'il s'agit bien du CYP 2D6 (Gueguen et coll, 1989). Des résultats comparables ont été obtenus simultanément dans d'autres laboratoires (Manns et coll, 1989, Zanger et coll, 1988). L'ADNc du clone LKMHC5 (codant pour le CYP2D6) a été inséré dans le plasmide EX-627 et exprimé dans l'*Escherichia coli*. Des enzymes de restrictions ont été utilisées pour couper plusieurs fragments de l'ADNc et obtenir ainsi différentes constructions d'ADNc. Les protéines de fusion correspondant à ces constructions ont été ensuite testées par immunoblot. Cette technique a permis de localiser au moins deux sites antigéniques linéaires sur la protéine CYP2D6 reconnue par les anti-LKM1 présents dans les sérums de patients atteints d'HAI de type 2. Un site antigénique principal reconnu par la plupart de sérums de patients anti-LKM1 positifs, a été identifié dans la région 254-271 de CYP2D6. Il a été démontré qu'un tripeptide de séquence TWD (Tyrosine, Tryptophane, Asparagine) en position 261-263, était essentiel pour la reconnaissance de la protéine par les auto-anticorps anti-LKM1 (Gueguen et coll, 1991). D'autres sites antigéniques linéaires ont été identifiés dans les régions: 321-351, 373-389 et 410-429 de l'auto-antigène CYP2D6 (Yamamoto et coll, 1993).

L'identification de l'antigène reconnu par les auto-anticorps anti-LKM1 dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2 a été réalisée par des techniques utilisant la dénaturation des protéines au sodium dedoxyl sulfate (SDS). Ainsi une seconde approche fut utilisée pour montrer que le cytochrome CYP2D6 était également reconnu par les auto-anticorps sous sa forme native. Cette approche exploite le fait que, d'une part, le cytochrome CYP2D6 possède une activité enzymatique facilement mesurable et, d'autre

part, que les anticorps anti-LKM1 inhibent *in vitro* l'hydroxylation d'un substrat de CYP2D6, le bufuralol (Zanger et coll, 1988). En effet, le cytochrome CYP2D6 est responsable du métabolisme oxydatif de plusieurs xénobiotiques, tels que la débrisoquine, le dextrométhorphan, le bufuralol et la spartéine. Cette inhibition a été confirmée plus tard *in vitro* en utilisant le métabolisme de la spartéine (Manns et coll, 1990). Ce composé anti-arythmique est maintenant utilisé *in vivo* comme substrat dans le métabolisme catalysé par CYP2D6 afin de caractériser le phénotype de patients atteints d'HA1 de type 2. Dans la population caucasienne, il a été décrit un polymorphisme génétique dans l'oxydation de la débrisoquine et de la spartéine. Le cytochrome CYP2D6 est absent ou non fonctionnel chez 5 à 10% de la population caucasienne. La population peut ainsi être subdivisée en métaboliseurs rapides (MR) et métaboliseurs lents (ML) (Gonzalez et coll, 1988). Le phénotype de patients atteints d'HA1 de type 2 correspond à celui des métaboliseurs rapides puisque la protéine CYP2D6 est non seulement présente mais aussi fonctionnelle (Jacqz-Aigrain et coll, 1990 et 1991). Ainsi le phénotype de métaboliseurs lents n'est pas un facteur prédisposant à l'HA1 de type 2. Les sérums anti-LKM1 sont capables d'inhiber *in vitro* le métabolisme du dextrométhorphan (DEM) catalysé par CYP2D6. Ceci montre que les auto-anticorps reconnaissent le cytochrome CYP2D6 dans sa forme native. L'objectif de notre étude était de déterminer la présence éventuelle des épitopes conformationnels de la protéine CYP2D6 reconnus par les anticorps anti-LKM1. Dans ce but, nous avons réalisé des études d'immuno-inhibition par les auto-anticorps anti-LKM1 de l'O-déméthylation du dextrométhorphan par le cytochrome CYP2D6.

Tableau 3. Comparaison de critères clinico-biologiques entre l'hépatite auto-immune de type 1 et de type 2 chez l'enfant.

	HAI de type 1	HAI de type 2
Moyenne d'âge chez l'enfant (ans)	10.5 ^a	7.4 ^a
Femmes/Hommes en (%)	75-87 ^{ab}	75-96 ^{ab}
Présence d'auto-anticorps pour diagnostic	SMA et/ou ANA (anti-F-actine)	LKM1 et/ou LC1 (Anti-CYP2D6 et/ou anti-FTCD)
Hypergammaglobulinémie	+++	+
Évolution cirrhotique (%)	43	82
Rémission sous stéroïdes	+++	++
Association avec HLA	B8, DR3, DRB1*1301 ^c	B14, DR3, DQB1*0201 ^c , C4A
Maladies auto-immunes associées:		
* Thyroïdite		++
* Diabète insulino-dépendant		+++
* Vitiligo		+++
* Colite ulcéreuse	++	
* Arthrite chronique	+++	
* Cholangite sclérosante	+++	

Abbréviations : SMA : anticorps anti-muscle lisse; ANA : anticorps anti-noyaux; LKM 1: anticorps anti-microsomes de foie et de rein de type 1; LC1 : anticorps anti-cytosol de type 1; CYP2D6 : le cytochrome P450 2D6; FTCD : formiminotransférase cyclodéaminase;

Références :

(a) Gregorio GV, et al. Hepatology, 1997.

(b) Maggiore G, et al. J. Pediatr Gastroenterol Nutr, 1993.

(c) Djalali-Saiah I, et al. J of hepatol, 2004.

3. Étude des sites antigéniques conformationnels de la protéine CYP2D6.

Résumé de l'article: Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by Liver/kidney microsomal antibodies. Jean-Charles Duclos-Vallée*, Oumnia Hajoui[#], Ana M. Yamamoto*, Evelyne Jacqz-Aigrain[^] and Fernando Alvarez[#]. *Gastroenterology* 1995;108:470-476

Les anticorps anti-LKM1, marqueurs sériques des hépatites auto-immunes de type 2, reconnaissent le cytochrome P450 de la sous-famille 2D de foie humain et de rat. Ces sérums anti-LKM1 réagissent avec l'auto-antigène CYP2D6 dans sa forme dénaturée ou native, isolée ou présente dans la fraction microsomale. Un épitope linéaire principal reconnu par la plupart des sérums anti-LKM1 positifs, a été identifié dans la région 254-271 de la protéine. Trois séquences antigéniques linéaires additionnelles ont été identifiées dans les régions 321-351, 373-389 et 410-429 (Yamamoto et coll, 1993). Le but de cette étude est de a) caractériser les sites antigéniques linéaires de l'auto-antigène CYP2D6 dans sa forme native et, b) détecter la présence de sites antigéniques conformationnels sur la protéine CYP2D6 reconnus par les auto-anticorps anti-LKM1 présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2. Quatre sérums de patients reconnaissant une ou plusieurs des séquences linéaires 254-271; 321-351; 373-389 et 410-429 ont été sélectionnés pour l'étude d'absorption et d'immuno-inhibition. Ces sérums ont tout d'abord été pré-absorbés avec les microsomes de foie humain puis testés en slot-blot vis-à-vis de chacune des séquences linéaires 254-271; 321-351; 373-389 et 410-429 (figure 1). Ces sérums pré-absorbés ne reconnaissaient plus les séquences peptidiques linéaires, contrairement aux sérums non pré-absorbés. Ces résultats nous montrent que les anticorps dirigés contre ces séquences linéaires sont pré-absorbés par les microsomes hépatiques. Ce résultat suggère que ces sites antigéniques linéaires sont

situés à la surface de l'auto-antigène CYP2D6 dans son état natif. Des études précédentes ont montré que les sérums anti-LKM1 inhibaient *in vitro* le métabolisme du dextrométhorphan (DEM) hydroxylé par la protéine CYP2D6 (Jacqz-Aigrain et coll, 1991). Le DEM subit une O-déméthylation par CYP2D6 pour former le dextrorphan (DOR). La quantité du DOR formée est alors mesurée par HPLC. Les caractéristiques de la cinétique enzymatique du métabolisme du DEM démontrent la nature fonctionnelle du CYP2D6 dans les microsomes de foie humain et donc le caractère phénotypique du métaboliseur rapide du donneur. Nous avons effectué l'étude de l'inhibition de la formation du DOR en pré-incubant des microsomes de foie avec des sérums anti-LKM1 positifs et des sérums de lapin anti-254-271 et anti-373-389. Quatre sérums anti-LKM1 ont été pré-absorbés avec des peptides synthétiques et testés par la suite pour leur capacité d'inhiber le métabolisme du DEM en HPLC. La méthodologie de pré-absorption a été vérifiée en slot-blot pour les 4 sérums. Nous avons aussi étudié la capacité d'inhibition du métabolisme du DEM par des anticorps dirigés contre différentes séquences linéaires (anticorps purifiés par affinité contre les peptides synthétiques et anticorps de lapin anti-254-271 et anti-373-389). Les résultats ont montré que a) les anticorps dirigés contre les séquences linéaires (les anticorps purifiés par affinité ou anticorps de lapin) ne provoquent pas d'inhibition enzymatique du métabolisme du DEM. b) les sérums de patients préalablement absorbés par des peptides synthétiques qui correspondent aux différentes séquences linéaires provoquent une inhibition métabolique tout à fait équivalente à celle provoquée par les sérums non pré-absorbés. D'autre part, les anticorps dirigés contre des sites linéaires (anticorps purifié par affinité contre des peptides synthétiques et sérums de lapin anti-254-271 et anti-373-389) n'inhibent pas le métabolisme du DEM.

Ces résultats confirment la présence d'anticorps dirigés contre des sites conformationnels de la protéine CYP2D6 dans le sérum de patients atteints

d'HAI de type 2. De plus, ces anticorps seraient responsables de l'immuno-inhibition enzymatique du DEM. En conclusion, les anticorps anti-LKM1 présents dans les sérums de patients atteints d'HAI de type 2 sont dirigés contre des sites antigéniques linéaires et conformationnels de la protéine CYP2D6.

CONFORMATIONAL EPITOPES ON CYP2D6 ARE RECOGNIZED BY LIVER/KIDNEY MICROSOMAL ANTIBODIES

Short title: Conformational epitopes on CYP2D6

Jean-Claude Duclos-Vallée*, Oumnia Hajoui[#], Ana M. Yamamoto*,
Evelyne Jacqz-Aigrain[^] and Fernando Alvarez[#].

*INSERM Unité 347, Hôpital de Bicêtre, Paris, France; [^]Unité de Pharmacologie Clinique, Hôpital Robert Debre, Paris, France; and [#]Service de Gastroentérologie, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Abbreviations: LKM1: liver/kidney microsomal antibody type 1; SMA: smooth-muscle antibody; LC1: liver cytosol type 1 antibody, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

Correspondance: Fernando Alvarez, M.D., Service de Gastroentérologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175, Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5. Tel. (514) 345-4626; FAX (514) 345-4999.

ABSTRACT

Background/Aims: Four linear antigenic sites have been shown on the CYP2D6 molecule that are recognized by serum positive for anti-liver/kidney microsomal antibody (LKM) type 1. The aim of this study was to search for antibodies against CYP2D6 conformational antigenic sites in LKM-1-positive sera. **Methods:** The capacity of four LKM-1-positive sera, before and after absorption with synthetic peptides representing CYP2D6 linear antigenic sites, and rabbit sera against linear antigenic sites between CYP2D6 amino acids 254-271 and 373-389, to inhibit the O-demethylation of dextromethorphan by CYP2D6 was tested in vitro. **Results:** Inhibition of O-demethylation of dextromethorphan was not modified by absorption of antibodies against linear CYP2D6 antigenic sites. In addition, rabbit sera against two of these sites did not inhibit the reaction. These results strongly suggest that antibodies against CYP2D6 conformational antigenic sites were present in LKM-1 -positive sera. **Conclusions:** The autoimmune response against CYP2D6 is directed against linear and conformational antigenic sites. These results strengthen the argument that the LKM-1 response is polyclonal and antigen driven.

INTRODUCTION

A subset of patients with autoimmune hepatitis have been shown to have circulating antibodies that recognize cytochromes P450 belonging to the 2D subfamily in rat and human liver, termed liver/kidney microsomal antibody (LKM) type 1 (1-4). The liver microsomal fraction contains several potentially antigenic proteins. However, LKM-1 -positive sera from patients with autoimmune hepatitis react specifically with CYP2D6, in its native or denatured forms, isolated or present in a microsomal fraction. Previous work showed that LKM-1 inhibited bufuralol (CYP2D6) metabolism but not that of other drugs using a human liver microsomal fraction (3), the only protein isolated from a human liver microsomal fraction by LKM-1 was native CYP2D6 (3), LKM-1 antibodies immunoprecipitated only CYP2D6 (in its native form) from [³⁵S]methionine-labeled total rat hepatocyte proteins (5), and there were no sequence homologies between CYP2D6 and other known microsomal proteins (other than partial homology with cytochromes P450 from other subfamilies). Most studies of antigen-antibody recognition have studied the denatured form of the antigens by immunoblot analysis of rat and human microsomal proteins (5-6) or on experimentally created fusion proteins (2, 4). From these studies, four different sequential or linear antigenic sites have been identified with use of LKM-1 -positive sera with CYP2D6, the human form of the P4502D subfamily. Almost all LKM-1 -positive sera recognized a sequence between amino acids 262 and 270, the so-called main antigenic site (7, 8), but a variable number of LKM-1 -positive sera recognized the other three peptides (9). These studies imply that the LKM-1 autoimmune response is at least oligoclonal.

The immune response to a foreign antigen is polyclonal, including antibodies to both linear or sequential antigenic sites and antibodies to conformational or discontinuous antigenic sites (10). A similar immune response has been also described to occur in several autoimmune diseases, consistent with the

hypothesis that random B-cell mutations are responsible for the generation of autoantibodies (11, 12). Therefore, if it could be shown that the LKM-1 autoimmune response also includes the generation of autoantibodies against native or undenatured conformational structures of CYP2D6, it would strongly suggest that it is a polyclonal, antigen-driven autoimmune response. Should this be the case, LKM-1 production would be an epiphenomenon secondary to hepatocyte lysis and release of microsomal antigen induced by an unknown agent.

To establish the presence of conformational antibodies to CYP2D6 in LKM-1 -positive sera, we analyzed the capacity of these antibodies to inhibit the CYP2D6 metabolism of dextromethorphan. The results obtained imply that the immune response in LKM-1 -positive autoimmune hepatitis is antigen driven and polyclonal because evidence of antibodies to conformational epitopes was found even after removal of antibodies to linear sequences from the sera.

MATERIALS AND METHODS

Synthetic Peptides

Four synthetic peptides spanning the CYP2D6 regions between amino acids 254-271, 321-351, 373-389 and 410-429, were obtained from Rhône Poulenc-Rorer (Vitry sur Seine, France). The synthesis was performed as previously described (7, 9).

These peptides were coupled to bovine serum albumin by the free N-terminal amino group using glutaraldehyde (13). A solution of 1.5 ml of each coupled peptide was dialyzed against 3 L of phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 24 hours at 4°C to remove free peptides and salts. These coupled peptides were used in enzyme-linked immunoassorbent assay (ELISA) and slot-blot techniques.

Microsomal Fraction Preparation

Livers were obtained from Sprague-Dawley rats, weighing 200 g. Samples of human liver were obtained from the right lobe of a brain-dead donor from whom only the left lobe was transplanted. Rat and human liver microsomal fractions were prepared by differential centrifugation as described previously (14). Microsomal protein concentration was measured as described by Lowry et al. (15). Microsomal fractions were stored at a concentration of microsomal protein of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ at -80°C until used.

Patient Sera

Sera positive for LKM-1 were from 15 children with autoimmune hepatitis (immunofluorescence titers: $> 1:1000$). Normal human sera, an anti-liver cytosol type 1 positive serum (immunofluorescence titer: 1:500), and an anti-smooth muscle antibody-positive serum (immunofluorescence titer: $> 1:1000$) were used as negative controls. All these autoantibodies were detected by indirect immunofluorescence on rat liver sections (courtesy of Professeur J-C Homberg, Hôpital St. Antoine, Paris, France). Sera were obtained before immunosuppressive treatment was started, and all contained similar concentrations of total immunoglobulin.

LKM-1 -positive sera were further characterized by ELISA, immunoblot, and slot-blot techniques. Antigens in these analyses were rat and human liver microsomal proteins, a CYP2D6 fusion protein, and synthetic peptides representing the CYP2D6 linear antigenic sites. β -Galactosidase and bovine serum albumin were used as controls when sera-specific reactivity against CYP2D6 fusion protein and coupled peptides, respectively, were tested. Sera positive for LKM-1 by indirect immunofluorescence showed titers between 1:6400 and $> 1:12,800$ by ELISA against microsomal proteins. These sera recognized proteins of 50 and 48kD in rat and human liver microsomal fractions when tested by immunoblot. None of the LKM-1 -positive sera reacted with any other liver microsomal protein under the immunoblot

conditions used in this study. All sera tested also recognized the CYP2D6 fusion protein. Fifteen different LKM-1 -positive sera were tested against the synthetic peptides representing the CYP2D6 regions between amino acids 254-271, 321-351, 373-389 and 410-429 (9). Results of those tests on all control sera were negative.

Affinity-Purified Antibodies

Antibodies against the four linear antigenic sites of CYP2D6 recognized by LKM-1 -positive sera were purified from patients' sera by affinity for synthetic peptides coupled to bovine serum albumin. Each peptide (see below) was separately bound to Affi-Gel 10 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) at a concentration of 1mg/mL. The mixture was incubated overnight and then poured into four different columns. Two to three milliliters of each LKM-1 -positive serum of known specificity for a particular peptide was filtered through the respective column three times. Purified antibody was eluted from the column with 5 mL of 50 mmol sodium citrate (pH 3). Affinity-purified antibodies were tested by ELISA against uncoupled synthetic peptides (9).

Rabbit Antibodies

One hundred fifty micrograms of peptides 254-271 and 373-389 coupled to albumin were emulsified with Freund's complete adjuvant and injected intramuscularly into mature New Zealand rabbits. The injection was repeated 1 week later. Eight and 16 weeks later, the same amount of each peptide was emulsified in Freund's incomplete adjuvant and injected subcutaneously in 6 different sites. Rabbits were bled 2 weeks after the last injection and tested by ELISA and slot-blot using uncoupled peptides as antigens (9). Goat anti-rabbit immunoglobulin labelled either with alkaline phosphatase or peroxidase (Biosys, Compiègne, France) were used as secondary antibodies. ELISA titers with these sera were $\geq 1:1,600$. Studies of

inhibition of dextromethorphan metabolism used rabbit sera at a dilution of 1:100.

Pre-absorption Studies

LKM-1 -positive sera were incubated with 250 μ g of microsomal fraction proteins for 3 hours at room temperature. Each tube was then centrifuged at 36,000 rpm, at 4°C, in a SW 50.1 rotor (Beckman, Palo Alto, CA) for 1 hour. Each supernatant was tested by slot-blot against the synthetic peptides.

LKM-1 -positive sera were also incubated with 10 μ g of each synthetic peptide and tested by slot-blot and inhibition of dextromethorphan metabolism. Dilutions of sera used in these studies were chosen to be those resulting in 50% inhibition of dextrophan formation (see below) to permit detection of small variations in the inhibition level after pre-absorption.

Metabolic Assays

To assay O-demethylation of dextromethorphan to dextrophan, the human liver microsomal fraction (250 μ g) was pre-incubated for 10 minutes at 37°C with 100 μ l of a regenerating system of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (10 mmol nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 50 mmol isocitrate, 10 U/mL isocitrate dehydrogenase, 50 mmol MgCl_2) in phosphate -buffered saline at pH 7.4. The final volume of incubation was 1 mL. The reaction was started by addition of dextromethorphan (1-500 μ mol). Dextromethorphan hydrobromide and dextrophan tartrate were provided by Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland. The reaction was stopped after 30 minutes by the addition of citric acid buffer (pH 3). Denatured protein was precipitated by centrifugation. The production of dextrophan was determined by high-performance liquid chromatography. The extraction procedures, chromatographic conditions, and equipment was the same as previously described (16).

To perform inhibition studies of dextrorphan formation, a human liver microsomal fraction was preincubated for 1 hour at 4°C with various dilutions of LKM-1 -positive or control sera, followed by the standard incubation procedure. The serum from one patient was tested at dilutions of 1:20 to 1:10,000 in order to determine the complete inhibition kinetics of dextrorphan formation, using concentrations of dextromethorphan between 5 and 500 μmol . Sera from other non-LKM-1 -positive patients were analyzed at dilutions of 1:100 and 1:5000, in line with the results of the kinetics analysis obtained in this study and in previous work (14). Affinity-purified antibodies at dilutions of 1:20 or 1:200 and rabbit anti-peptide antibodies at a dilution of 1:100 were used according to the results of ELISA analysis. Dextromethorphan was added to the reaction mixture at a concentration of 50 μmol . Control incubation studies were carried out with 100 μL serum obtained from a volunteer blood donor.

Data Analysis

All experiments were performed at least in duplicate. Untransformed data of kinetic studies were analyzed by the iterative non-linear-square fitting program (SIPHAR, société SIMED, France). The estimated kinetic parameters were the maximum velocity (V_{max}) and the apparent affinity constant (K_{m}).

RESULTS

Characterization of Antibodies

Four sera recognizing one or more peptides were used in all experiments; ELISA titers and specificity of these sera were as shown in Table 1. Affinity-purified antibodies were tested against individual uncoupled peptides by ELISA. Titers in the original sera were between 1:1600 and 1:3200 and after affinity purification were between 1:200 and 1:800. The drop

in antibody titers, when compared to original sera, was due to dilution by the elution buffer. Rabbit sera against specific peptides showed an ELISA titer of 1:6400 against the same uncoupled peptides.

When each serum was preabsorbed with total human microsomal proteins, antibodies to the specific peptides were no longer detected by slot-blot analysis (Figure 1). The same antibodies that recognize the CYP2D6 linear sequence therefore also bind to native microsomal proteins. Only antibodies against the peptide 373-389 were still detected after absorption, suggesting that this sequence was not completely exposed on the surface of the CYP2D6 native protein or that those antibodies had a low affinity for this antigenic site. A strong decrease or a disappearance of reactivity with slot-blot analysis was observed when sera were preabsorbed with 10 μ g of peptides (Figure 2).

Dextromethorphan O-Demethylation Kinetics

In the human liver microsomes tested, the formation of dextrorphan was linear with respect to protein (250-1000 μ g per assay) and time (15-60 minutes). Formation of dextrorphan in the range of dextromethorphan concentrations tested was best described with the assumption of monophasicity. The apparent affinity constant was 9.8 μ mol, and the maximal velocity was 12.0 nmol/mg of protein/hour. These kinetic parameters are in agreement with the reported values for CYP2D6 activity in humans (15).

Immunoinhibition of Dextrorphan Formation

The presence of CYP2D6 was confirmed in the microsomal fraction by demonstration of a 48-kilodalton protein that was recognized by one LKM-1 positive serum by immunoblot. The formation of dextrorphan and kinetic parameters confirmed that the human microsomal fraction used was from a CYP2D6-extensive metabolizer (Figure 3).

Inhibition of dextrophan formation was similar for each LKM-1 -positive serum tested (Figure 4). All the LKM-1 -positive sera inhibited the dextrophan formation irrespective of their specificity for the peptides representing different sequential antigenic sites on the CYP2D6. Control sera, however, did not affect the metabolism of dextromethorphan. In addition, sera showed similar levels of dextromethorphan metabolism before and after preabsorption with specific peptides (Table 2). Thus, most of the inhibition observed with the use of total serum from each patient was presumably due to other antibodies directed against other antigenic sites involved in CYP2D6 metabolism.

When affinity-purified antibodies or specific rabbit sera were used in immunoinhibition studies, the percentage of inhibition of dextromethorphan metabolism was very low (Table 3).

DISCUSSION

It has been shown that LKM-1 bind to CYP2D6, and that they may specifically inhibit the metabolism of different drugs (3, 16). These studies were not able to establish whether the binding was due to the recognition of linear or of conformational epitopes. In the present study, undenatured or native CYP2D6 molecules in human microsomal vesicles were found to bind most of the antibodies directed against peptides 254-271, 321-351 and 410-429 in LKM-1 -positive sera. Therefore, at least part of the binding was due to the recognition of the sequential CYP2D6 antigenic sites by antibodies in these sera. Further proof of the presence of conformational antibodies in LKM-1 positive sera come from the present studies of dextromethorphan. Dextromethorphan is O-demethylated (17) to dextrophan by CYP2D6 and the level of dextrophan has been used extensively to measure CYP2D6 activity in vitro. This metabolism was found to be inhibited by LKM1 antibodies from patients with autoimmune hepatitis. There are several

arguments in favor of the hypothesis that the inhibition of dextrophan production seen was due primarily to the presence of other antibodies in LKM-1 -positive sera that bind to conformational antigenic sites: 1) a similar level of inhibition was observed with use of LKM-1 -positive sera of different specificities to the linear antigenic sites; 2) inhibition of dextromethorphan metabolism by LKM-1 -positive sera was not affected by preabsorption of those sera with four different synthetic peptides representing the CYP2D6 linear antigenic sites; 3) affinity-purified antibodies to these same synthetic peptides either did not affect or minimally affected dextromethorphan metabolism; and 4) rabbit immune sera against peptides representing the CYP2D6 sequences 254-271 and 373-389 had no effect on the production of dextrophan. Altogether, these results show that LKM-1 against CYP2D6 linear antigenic sites bind to undenatured and native microsomal protein but are not responsible for the inhibition of dextromethorphan metabolism. LKM-1 -positive sera therefore should also contain other antibodies directed against conformational antigenic sites.

Waxman et al. (6) have shown that LKM-1 -positive sera from patients with autoimmune hepatitis also recognize P450 proteins from the 1A subfamily with the use of dot-blot testing and undenatured purified P450 forms as antigens. When these P450s from the 1A subfamily were denatured by heating and ionic detergent treatment, no LKM-1 binding was obtained. These results were interpreted as due to the presence of cross-reactivity between the 2D6 and 1A subfamilies. Further analysis of the linear antigenic sites on the CYP2D6 molecule (9) has shown that there is a low degree of molecular similarity between the known CYP2D6 peptide sequences and those of P450 from the 1A subfamily and other P450s (results not shown). It is therefore likely that the cross-reactivity of LKM-1 with P450s from the 1A subfamily is due to recognition of conformational antigenic sites of the latter subfamily, and these findings lend further support for the existence of autoantibodies directed towards CYP2D6 conformational structures.

Antibodies against P450 molecules could modify their metabolic activities by modification of the molecular structure, binding to the active site of the protein, or recognition of the substrate binding site of the P450. Antibodies against linear antigenic sites do not seem to be responsible for at least one of the proposed mechanisms because identified sequences were not localized at the active site of the molecule (9). Further work will be necessary in order to identify the mechanism or mechanisms involved in the inhibition of dextromethorphan metabolism by LKM1, the conformational antigenic sites involved, and the localization of the immunogenic structures within the molecule.

The present studies shown that LKM1-positive sera contain antibodies which recognize both linear and conformational antigenic sites of CYP2D6. This type of polyclonal response has also been described in other autoimmune liver diseases (18,19), and commonly occurs in response to challenge with foreign antigens (10). Thus, exposure of the CYP2D6 molecule during hepatocyte lysis could initiate an immune cascade including a polyclonal, antigen-driven response, as observed in patients with autoimmune hepatitis. Between 5 and 10% of the white population are poor metabolizers of the CYP2D6 (20) with, as a result, little CYP2D6 present in the liver. In the present study, the activity of CYP2D6 was measured in human liver microsomal vesicles obtained from an extensive metabolizer individual. This characteristic was established by measuring the CYP2D6 metabolic capacity, which was shown to be present in those vesicles by immunoblot. All patients with autoimmune hepatitis and LKM-1 tested so far have been found to be extensive metabolizers (21). The CYP2D6 protein and messenger RNA coding for it have also been found in livers of patients with LKM-1 -positive autoimmune hepatitis and have been found to be of the same size and activity as those found for normal livers (22,23). In addition, no major modifications were found in the gene coding for the CYP2D6 in the genomic DNA of those patients (23). These findings could be interpreted to mean that

the unmodified antigen must be present within hepatocytes and is liberated after liver injury. Further support for this hypothesis is that CYP2D6 did not appear to be exposed in the sinusoidal plasma membrane of rat or human hepatocytes (24).

Results from the present work and those in the literature have shown that a normal CYP2D6 is expressed in hepatocytes of LKM-1 -positive patients. This molecule seems to challenge the immune system as would a foreign antigen, but the reason for the molecule's immunogenicity remains unclear.

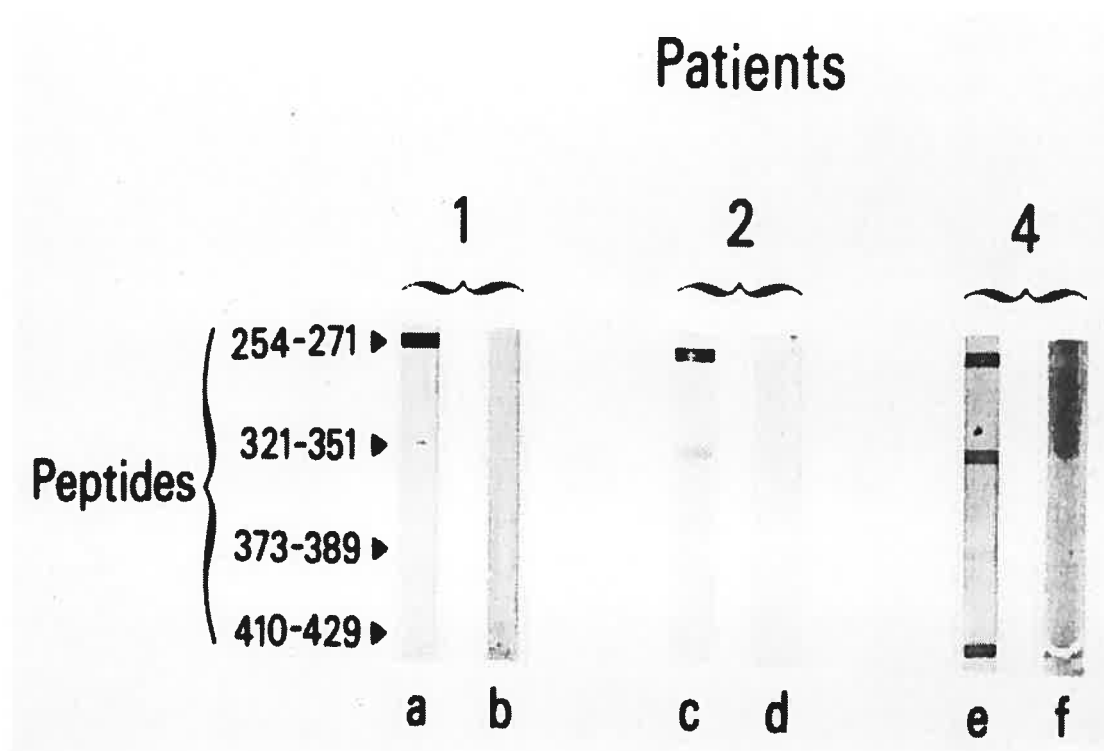


Figure 1. Patients' sera were tested using the slot-blot technique against synthetic peptides representing linear antigenic sites, before (a, c and e) and after (b, d and f) absorption with human liver microsomal proteins. The reactivity of patient 3 serum (not shown) against the peptide representing amino acids 373-389 of the CYP2D6 sequence was not absorbed by human liver microsomal proteins.

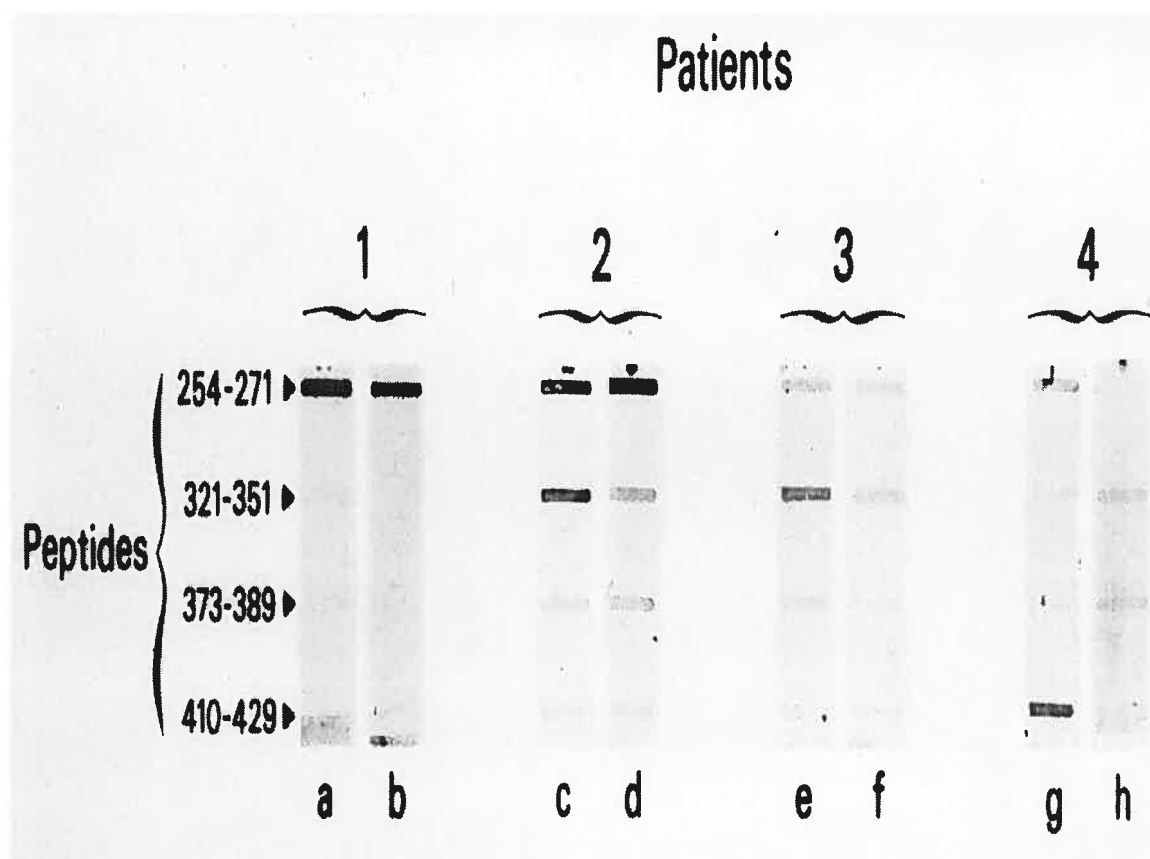


Figure 2. Patients' sera were tested using the slot-blot technique before (a, c, e and g) and after (b, d, f and h) absorption with different peptides.

Sera were preabsorbed as follows:

Patient 1 (a and b), serum with peptide representing amino acids 254-271; patient 2 (c and d), serum with peptide representing amino acids 321-351; patient 3 (e and f), serum with peptide representing amino acids 373-389; and patient 4 (g and h), serum with peptide representing amino acids 254-271 and 410-429.

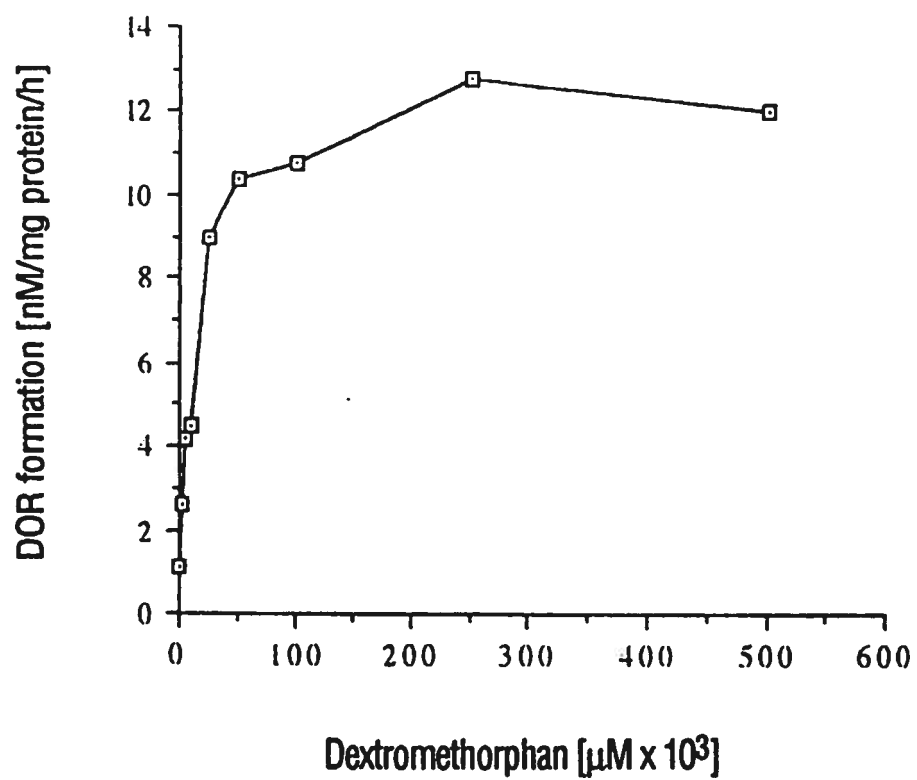


Figure 3. Kinetics of dextrophan formation in human liver microsomes.

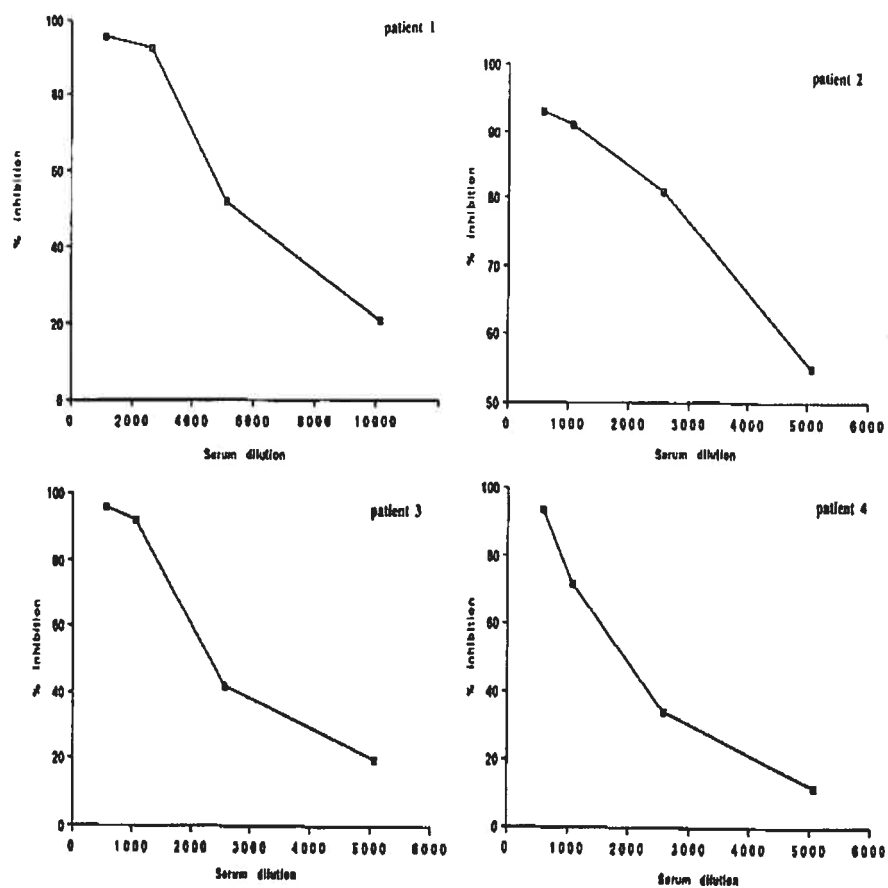


Figure 4. Inhibition of dextromethorphan metabolism by different dilutions of patient's sera. (A) Patient 1, (B) patient 2, (C) patient 3, and (D) patient 4. Results are expressed in percentage of control activities (in the absence of autoantibodies).

SERUM	ELISA titers against peptides			
	254-271	321-351	373-389	410-429
1	> 12,800	-	-	-
2	6,400	> 12,800	-	-
3	-	3,200	3,200	-
4	6,400	-	-	3,200

Table 1. ELISA titers of LKM-1-positive sera against uncoupled synthetic peptides representing CYP2D6 linear or sequential antigenic sites. Those LKM1 positive sera were used for analysis of CYP2D6 metabolism inhibition.

			% of inhibition	
Serum	Dilution	Peptide	Before pre-absorption	After pre-absorption
1	1:5,000	254-271	63.43	49.74
2	1:5,000	321-351	59.62	59.43
3	1:2,500	373-389	14.32	17.28
4	1:1,000	254-271 and 410-429	62.56	54.33

Table 2. Results of CYP2D6 metabolism inhibition by LKM-1 sera before and after absorption with synthetic peptides representing CYP2D6 linear or sequential antigenic sites.

Dilutions used were those causing ~ 50% inhibition of metabolism.

	Dilution	% of inhibition
Affinity purified		
anti-254-271	1:200	11.80
anti-321-351	1:20	15.20
anti-373-389	1:200	9.93
anti-410-429	1:200	10.59
Rabbit sera		
anti-254-271	1:100	16.53
anti-373-389	1:100	-7.20
Normal human serum	1:20	-1.68

Table 3. Results of CYP2D6 metabolism inhibition by affinity-purified antibodies and rabbit sera against CYP2D6 linear or sequential antigenic sites.

REFERENCES

1. Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 1988;168:801-806.
2. Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db 1. *Biochem Biophys Res Comm* 1989;159:542-547.
3. Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, Homberg JC, Meyer UA. Antibodies against human cytochrome P450 db 1 in autoimmune hepatitis type II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;27:8256-8260.
4. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450 db1. *J Clin Invest* 1989;83:1066-1072.
5. Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, Kreibich G. Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1985;161:1231-1236.
6. Waxman DJ, Lapenson DP, Krishnan M, Bernard O, Kreibich G, Alvarez F. Antibodies to liver/kidney microsome 1 in chronic active hepatitis recognize specific forms of hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 1988;95:1326-1331.
7. Gueguen M, Boniface O, Bernard O, Clerc F, Cartwright T, Alvarez F. Identification of the main epitope on human cytochrome P450IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *J Autoimm* 1991;4:607-615.
8. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991;88:1370-1378.
9. Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P45011D6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993;23:1105-1111.

10. Lando G, Berzofsky JA, Reichlin M. Antigenic structure of sperm whale myoglobin:I. Partition of specificities between antibodies reactive with peptide and native protein. *J Immunol* 1982;129:206-211.
11. Guldner HH, Netter HJ, Szosteki C, Lakomek HJ, Will H. Epitope mapping with a recombinant human 68-kDa (U1) ribonucleoprotein antigen reveals heterogenous autoantibody profiles in human autoimmune sera. *J Immunol* 1988;141:469-475.
12. Randen I, Pascual V, Victor K, Thompson KM, Forre O, Capra JD, Natvig JB. Synovial IgG rheumatoid factors show evidence of an antigen-driven immune response and a shift in the V gene repertoire compared to IgM rheumatoid factors. *Eur J Immunol* 1993; 23:1220-1225.
13. Harlow E, Lane D. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1988:78-137.
14. Amar-Costesec AH, Beaufay M, Wibo D, Thines-Sempoux E, Feytmans E, Robbi M, Berthet J. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. Preparation and composition of the microsomal fraction. *J Cell Biol* 1974;61:201-212.
15. Lowry D, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1959;193:265-275.
16. Jacqz-Aigrain E, Gueguen M, Zanger UM, Robieux I, Alvarez F. Cytochrome P450IID subfamily in non-human primates. Catalytical and immunological characterization. *Biochem Pharmacol* 1991;11: 1657-1663.
17. Dayer P, Leemam T, Striberi R. Dextromethorphan O-demethylation in the liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P450db1 activity. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:34-40.
18. Rowley MJ, McNeilage LJ, Armstrong JM, Mackay IR. Inhibitory autoantibody to a conformational epitope of the pyruvate dehydrogenase complex, the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60:356-370.

19. Surh C, Coppel R, Gershwin M. Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1990;144:3367-3374.
20. Jaqz E, Dulac H, Mathieu H. Phenotyping polymorphic drug metabolism in the french caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol* 1988;35:167-171.
21. Jacqz-Aigrain E, Laurent J, Alvarez F. Dextromethorphan phenotypes in paediatric patients with autoimmune hepatitis. *Br J Clin Pharmacol* 1990;30:153.
22. Manns M, Zanger U, Gerken G, Sullivan KF, Meyer Zum Bfshenfelde KH, Meyer UA, Eichelbaum M. Patients with type II autoimmune hepatitis express functionally intact cytochrome P450db1 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro but not in vivo. *Hepatology* 1990;12:127-132.
23. Yamamoto AM, Mura C, Morales MG, Bernard O, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Study of CYP2D6 gene in children with autoimmune hepatitis and P450IID6 autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:251-255.
24. Yamamoto AM, Mura C, De Lemos-Chiarandini C, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Cytochrome P45011D6 recognized by LKM1 antibody is not exposed on the surface of hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 1993;92:381-390.

Acknowledgements: We thank Dr. S. Martin for critical reading of the manuscript, Dr. K. Paradis for his support, and Ms. D. Lachapelle for secretarial assistance. This work was supported by grants from the Caisse Nationale d'Assurance Maladies des Travailleurs Salariés/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, and a Medical Research Council grant (to F.A).

B. Identification de l'auto-antigène FTCD reconnu par les anticorps anti-LC1.

Résumé de l'article: Formiminotransférase Cyclodeaminase Is an Organ-Specific Autoantigen Recognized by Sera of Patients With Autoimmune Hepatitis. Pascal Lapierre*, Oumnia Hajoui*, Jean-Claude Homberg‡, Fernando Alvarez*. *Gastroenterology* 1999; 116(3) :643-9

Un nouvel auto-anticorps dirigé contre une protéine du cytosol hépatique a été décrit chez les patients atteints d'HAI de type 2. Cet anticorps anti-cytosol est connu sous le nom de LC1 (liver cytosol type 1) (Martini et coll, 1988). Les anticorps anti-LC1 sont les seuls marqueurs présents dans le sérum de 10% de patients atteints d'HAI de type 2 et sont associés dans 30% des cas avec les anticorps anti-LKM1 (Martini et coll, 1988). Les anticorps anti-LC1 sont détectés en immunofluorescence indirecte en utilisant des coupes de foie de rat et de souris. Ces anticorps donnent alors une coloration homogène dans le cytosol des hépatocytes autour de la veine centrale. Cette fluorescence sur coupes de foie disparaît lorsque les sérums de patients anti-LC1 positifs, sont pré-absorbés par la fraction cytosolique de foie de rat. De plus, les anticorps anti-LC1 ne réagissent pas avec les cellules des tubules proximaux rénaux contrairement aux anticorps anti-LKM1.

L'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 est localisé dans la fraction cytosolique du foie. En chromatographie sur un gel de filtration, l'auto-antigène est une protéine oligomérique de poids moléculaire de 240 à 290 kD chez l'homme et de 220 à 270 kD chez le rat. En immunoblot, les anticorps anti-LC1 reconnaissent cependant une protéine de la fraction cytosolique ayant un poids moléculaire de 62 kD chez l'humain et 58 kD chez le rat. L'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 positifs est donc une protéine tétramérique pauvre en chaînes de carbohydrates et qui ne possède pas de ponts disulfures interchaînes (Abuaf et coll, 1992). Ces anticorps anti-LC1 réagissent mieux avec l'antigène du cytosol de foie

humain qu'avec celui de rat, mais une identité partielle a été démontrée par immunodiffusion double entre ces deux antigènes (Abuaf et coll, 1992). Toutefois, l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 n'est pas encore identifié. Dans cette étude, nous avons donc cherché à identifier l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 chez les patients atteints d'HAI de type 2. La démarche expérimentale choisie est l'immuno-criblage d'une banque d'expression d'ADN complémentaire des cellules HepG2 en utilisant les anticorps anti-LC1 présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2. Cette stratégie a été utilisée auparavant pour identifier l'auto-antigène P450 2D6 reconnu par les anticorps anti-LKM1 (Gueguen et coll, 1988). En immunofluorescence indirecte, les anticorps anti-LKM1 masquent les anticorps anti-LC1. De plus, les hépatocytes humains expriment aussi bien le cytochrome P450 2D6 que l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1. Par contre, les cellules HepG2 n'expriment pas le cytochrome P450 2D6, mais expriment une protéine de 62 kD immunoprécipitée par les sérums de patients LC1+ et LKM1/LC1+. Nous avons utilisé un sérum de patient anti-LC1+ pour immuno-criblage à partir d'une librairie d'ADNc des cellules HepG2 et parmi les six clones isolés, seulement deux se sont révélés positifs une fois la protéine de fusion préparée et testée en immunoblot. Les deux clones ont ensuite été séquencés et la comparaison de séquences avec la banque de données (Genbank) a été effectuée. Un clone de 653 pb appelé LCHC1 (*Liver cytosol human clone 1*) a été utilisé pour le reste des travaux. Nous avons alors trouvé une forte homologie (85.2%) entre la protéine codée par LCHC1 et la région C-terminale d'une protéine de foie de cochon appelée la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD). Ce résultat nous a permis de suggérer que l'auto-antigène humain de 62 kD reconnu par les anticorps anti-LC1 pourrait être la protéine FTCD.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons fait appel à plusieurs stratégies. Tout d'abord, les ARN messagers isolés à partir de foie humain

et de cellules HepG2, ont été hybridés avec les sondes d'ADNc de *LCHC1* et de P450 2D6. Les résultats ont montré que l'ARNm du FTCD est présent dans les cellules HepG2 et dans le foie humain alors que l'ARNm du P450 2D6 est exprimé seulement dans le foie humain. Le clone *LCHC1* a par la suite été inséré dans un vecteur d'expression (pMal-c) et la protéine recombinante a été produite et testée en immunoblot. Les résultats sont les suivants : a) tous les sérums de patients anti-LC1 positifs et anti-LC1/LKM1 positifs ont reconnu cette protéine recombinante. Aucun des sérums de patients témoins (HAI de type 1(SMA+), HAI de type 2 (LKM1+), Cirrhose biliaire primitive, et sérums normaux) n'a reconnu cette protéine recombinante. Ceci suggèrait que la région C-terminale de la protéine FTCD possède l'épitope principal reconnu par les anticorps anti-LC1 positifs; b) les sérums de souris immunisés avec la protéine recombinante *LCHC1* reconnaissent en immunoblot la protéine de 62 kD de la fraction cytosolique de foie humain; c) les anticorps purifiés par affinité avec la protéine recombinante (sérums de souris immunisés et sérums de patients anti-LC1+) reconnaissent aussi en immunoblot la protéine de 62 kD de cytosol de foie humain, et finalement d) l'immunodiffusion double a montré une identité parfaite entre la protéine recombinante du clone *LCHC1* et la protéine cytosolique reconnue par les anticorps anti-LC1.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD) est l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 chez les patients atteints d'HAI de type 2. La région C-terminale de 146 acides aminés de la protéine FTCD contient l'épitope principal reconnu par les anticorps anti-LC1. La FTCD est une protéine principalement exprimée dans les hépatocytes où elle est présente sous forme libre ou en association avec le complexe golgien (Bashour et coll, 1998, Hennig et coll, 1998). La FTCD est une enzyme impliquée dans le métabolisme des folates qui possède deux fonctions indépendantes, transférase et désaminase (MacKenzie et coll, 1980). En microscopie électronique, cette enzyme est

sous forme d'un octamère formé de 8 sous-unités identiques arrangées en une structure circulaire (Beaudet et coll, 1976). Nous avons identifié l'enzyme FTCD comme auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1 et ce résultat devrait permettre par la suite de mettre au point un test de dépistage plus spécifique de l'HAI de type 2 surtout dans le cas où les anticorps anti-LC1 sont les seuls marqueurs sérologiques de cette maladie.

**Formiminotransferase Cyclodeaminase Is an Organ-Specific
Autoantigen Recognized by Sera of Patients With Autoimmune
Hepatitis**

Authors: Pascal Lapierre*, Oumnia Hajoui*, Jean-Claude Homberg‡, Fernando Alvarez* Gastroenterology 116(3) :643-9, 1999 Mar.

Affiliations:

* Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital Sainte-Justine,
3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

‡Laboratoire d'Immunologie, Hôpital St-Antoine, 75571 Paris Cedex 12,
France

Short title: Liver cytosol antigen in autoimmune hepatitis

Abbreviations: AIH, autoimmune hepatitis. ANA, antinuclear antibody. FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase. IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactoside. LC1, liver cytosol type 1 antibody; LCHC1, Liver cytosol human clone 1. LKM1, liver-kidney microsome antibody type 1. MEM, minimum essential medium. SDS, sodium dodecyl sulfate. SMA, anti-smooth muscle antibody.

Correspondence to: Fernando Alvarez, M.D. Service de gastroentérologie Hôpital Sainte-Justine 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5. Tél: (514) 345-4626, Fax: (514) 345-4999

ABSTRACT

Background & Aims: Anti-liver cytosol type 1 autoantibodies have been reported in association with anti-liver-kidney microsome type 1 autoantibodies in 30% of patients with autoimmune hepatitis type II. In 10% of cases, anti-liver cytosol type 1 antibodies are the only liver-related circulating autoantibodies. The liver cytosol antigen is a liver-specific 62-kilodalton protein present in the cell as an oligomer of $\cong 240$ kDa. The aim of this study was to identify the antigen recognized by anti-liver cytosol antibody. Methods: To identify the liver cytosol antigen, an anti-liver cytosol type 1-positive serum was used for the screening of a complementary DNA library from HepG2 cells. Double immunodiffusion method was used to show the identity between the cytosolic and the cloned protein. Results: The sequence of two isolated clones showed 85.2% homology with the formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) enzyme from pig liver. Antibodies purified by affinity with the recombinant protein and sera from mice immunized with FTCD recognized a 62-kilodalton human cytosolic protein when tested by immunoblot. The identity of precipitation lines was found between the cytosolic antigen and FTCD. Conclusions: This enzyme is a liver-specific antigen recognized by the sera of patients with autoimmune hepatitis.

Introduction

Autoimmune Hepatitis (AIH) is a disorder of unknown etiology responsible for a progressive destruction of the hepatic parenchyma. It has a high mortality rate if left untreated (1). One of the characteristics of this disease is the presence of circulating autoantibodies in almost 90% of patients' sera. Clinical and serological differences between patients lead to the classification of AIH into two types. Type 1 is characterized by the presence of smooth muscle antibodies (SMAs) and/or antinuclear antibodies (ANAs), whereas those from type II patients show anti-liver-kidney microsomal antibodies type 1 (LKM1) (2, 3). Recently, a new serological marker, anti-liver cytosol type 1 antibody (LC1), was identified in 30% of patients with an AIH type II (4). Less frequently, anti-LC1 antibodies may be associated with the presence of SMAs and/or ANAs in sera from patients with AIH (5). In addition, anti-LC1 proved to be the only serological marker in 10% of patients with AIH tested (4). When tested by indirect immunofluorescence, anti-LC1 staining characteristically spares the cellular layer around the central veins of mouse and rat liver (4). However, anti-LC1 is frequently associated with LKM1, a situation in which the typical anti-LC1 staining pattern may be masked by the more diffuse stain pattern characteristic of LKM1. The antigen recognized by LC1 was identified by immunoblot as a 62-kilodalton protein in the human liver cytosol subcellular fraction. Gel filtration studies indicated that the antigen in the cytosol has a tetrameric structure (6). A good correlation was found between anti-LC1 concentration and AIH activity (7). These results led to the speculation that anti-LC1 play a role in the pathogenesis of AIH (7). After the screening of a complementary DNA (cDNA) library with anti-LC1-positive sera, we identified human liver formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) as the specific antigen recognized by LC1 antibodies. Identification of this antigen may permit not only a characterization of the autoimmune response but also exploration of its pathogenic relevance and the development of more specific diagnostic tests and, eventually, of immunotherapy (8).

Materials and Methods

Patients' sera: Forty sera were collected from patients with AIH before starting any immunosuppressive treatment. The diagnosis of AIH was made according to the criteria defined by the International Autoimmune Hepatitis Group (1). Indirect immunofluorescence was used for the detection of SMAs. Ten sera were positive for SMAs (titers $>1:100$, serum gammaglobulin levels between 19.5 and 44 g/L). Nineteen sera were positive for LKM1 by indirect immunofluorescence (titers of 1:500-1:100,000; serum gammaglobulin levels, 13.5-43 g/L). Twenty-three patients were positive for anti-LC1, 12 cases in association with LKM1. Anti-LC1 positivity was shown by immunodiffusion (titers 1:4-1:2048; serum gammaglobulin levels of 14.6-35.8 g/L). All positive anti-LC1 reacted with a 62- kilodaton protein when tested by immunoblot against a human liver cytosol subcellular fraction. Thirty-one sera were also used as controls: 10 from normal individuals, 11 from patients with a chronic hepatitis C virus infection and LKM1 antibodies in their sera, and 10 from patients with primary biliary cirrhosis.

HepG2 Cells Labeling and Immunoprecipitation: HepG2 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA), and maintained in a minimum essential medium (MEM) containing Earle's salts, nonessential amino acids, glutamine, 10% fetal calf serum and streptomycin/penicillin. Cultures were made in six-well plates and maintained at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. For labeling, cells (approximately 1×10^6) were rinsed with phosphate-buffered- saline (PBS) and incubated for 30 minutes at 37°C with MEM without cysteine. This medium was then replaced by fresh MEM with 200 $\mu\text{Ci/mL}$ of (S^{35}) cysteine, and cells maintained at 37°C for another 30 minutes. The radioactive medium was then replaced by MEM with unlabelled cysteine at 500 times

higher concentrations than the radioactive amino acid. Incubation was continued for 90 minutes at 37°C. The cells were washed and resuspended in 500 µL of the following buffer: 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 mmol/L MgCl₂, 1% sodium deoxycholate, and 1% Nonidet P-40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Immunoprecipitation was then performed with 200 µL of HepG2 cell suspension diluted with 4 volumes of 190 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-Cl (pH 7.4), 6 mmol/L EDTA and 2.5% Triton X-100. Ten microliters of each tested serum were added to the immunoprecipitation test tube, and the samples were incubated at 4°C overnight. Immunocomplexes were precipitated by adding protein A-Sepharose (20 µL of swollen beads) to the solution and incubating it for 2 hours at room temperature. The immunoprecipitate was analyzed in a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

RNA preparation and analysis: Total RNA was prepared from human liver (1g) and HepG2 cells (2×10^7) using the single-step method as described previously (9). The total RNA was then analysed by Northern blot. Five micrograms of total RNA from human liver and HepG2 cells was loaded on a 1% agarose-formaldehyde gel and then transferred onto a nylon membrane (Amersham Life Sciences, Oakville, Ontario, Canada). The membranes were probed with the P450 2D6 cDNA and the cDNA fragment of liver cytosol human clone 1 (LCHC1) ³²P-labeled using the random priming method. The membranes were prehybridized for 3 hours at 42°C in 5x standard saline citrate, 5x Denhardt's solution, 50% formamide, and 1% SDS and then were hybridized in the same solution plus 1×10^6 cpm/mL of labeled probe overnight at 42°C. The membranes were washed and exposed for 1 week for autoradiography.

Isolation and characterization of cDNA clones: To isolate the cDNA encoding for the LC1 antigen, a λgt 11 HepG2 cDNA expression library

(Clontech, Palo Alto, CA) was used. Sera from 2 patients with anti-LC1 antibody but negative for LKM1, as confirmed by immunoblot analysis, were used to screen the library. A total of 5.6×10^6 recombinants were screened using the standard procedure (10). The filters were incubated overnight at 4°C in a 1:1000 dilution of each sera, and the putative positive clones were plaque purified. To confirm this, fusion proteins were prepared from our recombinant phages. Recombinant phage lysogens were identified and grew overnight at 32°C in Luria-Bertani (LB)/ampicillin with good aeration. The temperature was then shifted to 42°C for 30 minutes, 10 mmol/L isopropyl-1-thio- β -*D*-galactoside (IPTG) was added and the culture incubated at 37°C for 2 hours. The cultures were centrifuged, resuspended in SDS gel loading buffer, and boiled for 5 minutes. The resulting proteins were then analyzed by immunoblot.

cDNA subcloning and sequencing: The restricted fragment of the positive LCHC1 clones were subcloned into the EcoR1 site of pBluescript sk+ cloning vector using standard molecular biology techniques. The cDNAs were then sequenced using the dideoxy-chain termination method. Both the M13-20 oligonucleotide primer and the internal primers (Immunocorp Inc, Montréal, Québec, Canada) were used to sequence both clones.

Expression and purification of the LCHC1 fusion protein: The EcoR1 fragment of the λ gt11 clone was subcloned into the EcoR1 site of the pMal vector (New England Biolaboratories, Beverly, MA) conserving the reading frame of λ gt11. The resulting construction was then transformed into the TB1 *Escherichia coli* strain using a standard method. A 100 mL LB/ampicillin culture was grown to 2×10^8 cells/ml and then induced with IPTG at 0.3 mmol/L for 90 minutes at 37°C with shaking. The bacteria were then sonicated in 5 mL of 20 mmol/L Tris-Cl (pH 7.4), 0.2 mol/L NaCl, and 1 mmol/L EDTA (column buffer). This solution was incubated with 1 mL of maltose resin (New England Biolaboratories) overnight at 4°C with gentle

shaking. The maltose resin was loaded onto a 0.8 x 4-cm chromatography column (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA), the column was washed with 12 volumes of column buffer, and the protein eluted with column buffer and 10 mmol/L maltose. The different fractions were electrophoresed on 10% SDS-PAGE to detect the fusion protein.

Mice immunization and antibody purification: Three C57BL6 female mice aged 6 weeks were injected intraperitoneally with 50 µg of the purified recombinant (LCHC1) protein emulsified in 200 µL of Freund's complete adjuvant. Three weeks later, the mice were boosted intraperitoneally with 50 µg of the same protein emulsified in 200 µL of incomplete Freund's adjuvant. One week later, the mice were bled, and the sera were tested by immunoblot analysis. For antibody purification, a total of 50 µg of the purified LCHC1 recombinant protein was coupled to activated 6-aminohexanoic acid-sepharose 4B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The washed resin was loaded onto a 0.8 x 4 cm chromatography column (Bio-Rad laboratories, CA) and 50 µL of anti-LC1 positive serum diluted in 1 mL of PBS applied to the column. The column was then washed with 10 ml PBS, and the affinity-purified antibody was eluted with 0.05 mol/L glycine and 0.15 mol/L NaCl, titrated with HCl to pH 2.3. The purified antibodies were then tested against human liver cytosol subcellular fraction by immunoblot analysis.

Immunoblot analysis: The proteins were electrophoresed on 10% SDS-PAGE. Separated proteins were electroblotted onto nitrocellulose (Amersham Life Science, Canada). The membranes were blocked in PBS/0.2% gelatin for 1 hour and incubated overnight at 4°C with the primary antibody (at dilution of 1:100 and 1:200). Detection was performed using a peroxidase-conjugated secondary antibody which was species specific (Biosource international, Camarillo, CA).

Immunodiffusion: Immunoprecipitation was carried out using Ouchterlony double immunodiffusion method as described previously (11). Agarose at a concentration of 0.5% in PBS, pH 8.2 was poured onto plates, and wells 3-7 mm in diameter and 5 mm apart (measured between circumferences) were cut. In the center well, 50 μ L of human liver cytosol subcellular fraction containing 2.5 mg of proteins was pipetted. In the other wells, 20 μ L of undiluted serum from an anti-LC1 positive patient and rabbit polyclonal anti-pig FTCD antibody that cross-reacts with human FTCD (kindly provided by Dr. R.E. MacKenzie, Mc Gill University, Montreal, Québec, Canada) was pipetted.

Computer analysis of DNA and amino acid sequence: The blast program at the Genbank database of the National Institutes of Health was used to screen for homologous protein or DNA sequences.

RESULTS

Cloning of the LC1 antigen from HepG2 cells

HepG2 cells were labeled with (S^{35}) Cystein and the solubilized cellular proteins were immunoprecipitated with LKM1 and with SMAs; no band was observed (Figure 1A). On the other hand, a 62-kilodaton protein, the reported molecular weight for the LC1 antigen (6), was immunoprecipitated by anti-LC1 positive sera (Figure 1A).

Anti-LC1-positive serum capable of immunoprecipitating only a 62-kilodaton protein from HepG2 cells was used to screen a cDNA library in the λ gt11 phage from the same cell line. Six clones were identified; however, only two were still positive when the recombinant fusion protein was prepared and tested by immunoblot. The sequences of these two clones (GenBank accession number U91541) overlap and are 85.2% homologous with the already known coding sequence in the 3' region of the FTCD from pig liver (Figure 2A and 2B) (12). A cDNA of 653 base pairs, the LCHC1, was used

to establish the relevance of the HepG2 cell line to detect anti-LC1 antibodies and identify the antigen. Normal human liver and HepG2 cell total RNAs were hybridized using P450 2D6 or LCHC1 probes, showing that the FTCD messenger RNA (mRNA) is present in both cases but that the P450 2D6 mRNA is only present in the normal human liver (Figure 1B). The estimated size of the mRNA that hybridized to the LCHC1 probe was of \approx 1850 bases.

Verification that the LCHC1 cDNA codes for the LC1 antigen

The LCHC1 recombinant fusion protein (human FTCD C-terminal region) was identified using an AIH serum positive only for anti-LC1 antibodies when tested by indirect immunofluorescence, immunodiffusion and immunoblot. At this point, it seemed necessary to test for an identical reactivity in other anti-LC1 positive sera characterized by the same techniques. Thus, the LCHC1 cDNA was subcloned in the pMal in order to allow the preparation of large amounts of the recombinant fusion protein. Forty sera from patients with AIH (10 positive for SMAs, 7 for LKM1, 12 for LKM1/LC1 and 11 for anti-LC1) and 30 control sera were tested by immunoblot against the isolated LCHC1 recombinant fusion protein. These experiments show that only the LKM1/LC1 and the anti-LC1- positive sera reacted with this antigen (Figure 3A).

The final step to prove that the FTCD corresponds to the LC1 antigen, was aimed at a study of the cross-reactivity between the LCHC1 recombinant fusion protein and the human liver cytosol 62-kilodalton protein. First, anti-LC1 were affinity purified from a patient serum using the LCHC1 recombinant fusion protein as an antigen. Furthermore, these antibodies reacted to a 62-kilodalton human liver cytosol protein when tested by immunoblot (Figure 3B). The LCHC1 recombinant fusion protein was also injected into 3 C57BL6 female mice. Sera from 2 of 3 immunized mice recognized the human cytosol 62-kilodalton protein (Figure 3B).

Identity between LC1 antigen and FTCD

An Ouchterlony immunodiffusion method was applied to search for further proof that FTCD is the antigen recognized by anti-LC1s. A complete and symmetrical fusion of precipitation lines was observed using anti-LC1 positive serum and rabbit polyclonal anti-pig FTCD antibody (Figure 4). This result indicates an identity between the LC1 antigen and FTCD.

DISCUSSION

Because other autoantibodies are frequently found in AIH sera, which at low titers may not be detected by the usual diagnostic tests, molecular cloning of the LC1 antigen requires a human liver cell line expressing only this antigen. Previous work showed that anti-LC1s react more often against human than against rat antigens when tested by immunoblot. However a partial identity between precipitation lines is found when both antigens are tested by immunodiffusion techniques (4). Human liver cells must therefore be used for the identification of the antigen. Human hepatocytes express equally well both the LC1 antigen and cytochrome P450 2D6, which corresponds to the LKM1 antigen (4, 6, 13-15). The HepG2 cell line, an immortalized human hepatoma cell line, retains many functions of mature human hepatocytes. The cytochrome P450 2D6, however, is not constitutively expressed in HepG2 cells. This hepatoma cell line became an ideal tool for cloning the LC1 antigen. This task was carried out using an HepG2 cDNA expression library screened with anti-LC1 positive sera.

The LCHC1 codes for a 653-base pair cDNA that shows a high similarity with the cDNA of the pig liver FTCD cytosolic enzyme. In Northern blots, the LCHC1 cDNA hybridized a mRNA of $\approx 1,850$ bases from human liver and HepG2 cells, similar to the described size for the FTCD mRNA from pig liver (12). These results show that the LCHC1 cDNA codes for the C-terminal region of the human liver FTCD.

The cross reactivity between the pMal-LCHC1 recombinant protein and the 62-kilodalton human liver cytosolic protein was shown by three methods: 1) all the anti-LC1-positive sera recognized the LCHC1 recombinant protein; 2) antibodies purified by affinity with the LCHC1 protein recognized a 62-kilodalton human liver cytosolic protein; and 3) sera from mice immunized with the LCHC1 recombinant protein also recognized the 62-kilodalton human cytosolic antigen. The LCHC1 codes for a peptide of approximately 150 amino acids from the FTCD C-terminal region. All the anti-LC1-positive sera, as detected by indirect immunofluorescence and/or immunodiffusion,

reacted against the LCHC1 protein by immunoblot, suggesting that this portion of the antigen contains a major linear epitope. Immunodiffusion is the standard method for detection of anti-LC1s (4, 16). This method has been performed to show that the same antigen was immunoprecipitated by anti-LC1s and anti-FTCD antibodies.

Altogether, these results clearly show that the human liver FTCD enzyme is the antigen recognized by anti-LC1 antibodies. Also supportive of this conclusion are previous publications showing that the mature structure of the LC1 antigen is polymeric with a molecular weight of 240 to 290 kilodaltons (6). This possible tetrameric structure (each subunit of 62 kilodaltons) was also described as the mature-functional structure of the pig liver FTCD (17). FTCD is a polymeric bifunctional enzyme involved in the metabolism of folates; more specifically it channels one carbon unit from formiminoglutamate (a metabolite in the histidine degradation pathway) to the folate pool (12). How either the structure or activity of this enzyme relates to the development of specific autoantibodies toward this protein remains to be investigated. Interestingly, the FTCD has not been detected in yeast or bacteria (12). The identification of the LC1 antigen as FTCD can only be a step in our understanding of the pathogenesis of AIH.

Our current work is directed towards the development of more specific and faster diagnostic tests than those so far used for the detection of anti-LC1s. One of 10 patients with AIH does not display classical autoantibodies, a fact that delays detection and treatment of a potentially lethal disease. Our study will undoubtedly make an important contribution to the diagnosis of AIH. In addition, the eventual characterization of FTCD epitopes as well as the T-cell specific response against this protein, may be of pathogenic relevance and could open the way to immunotherapy as reported recently in an animal model of insulin dependent diabetes mellitus (8).

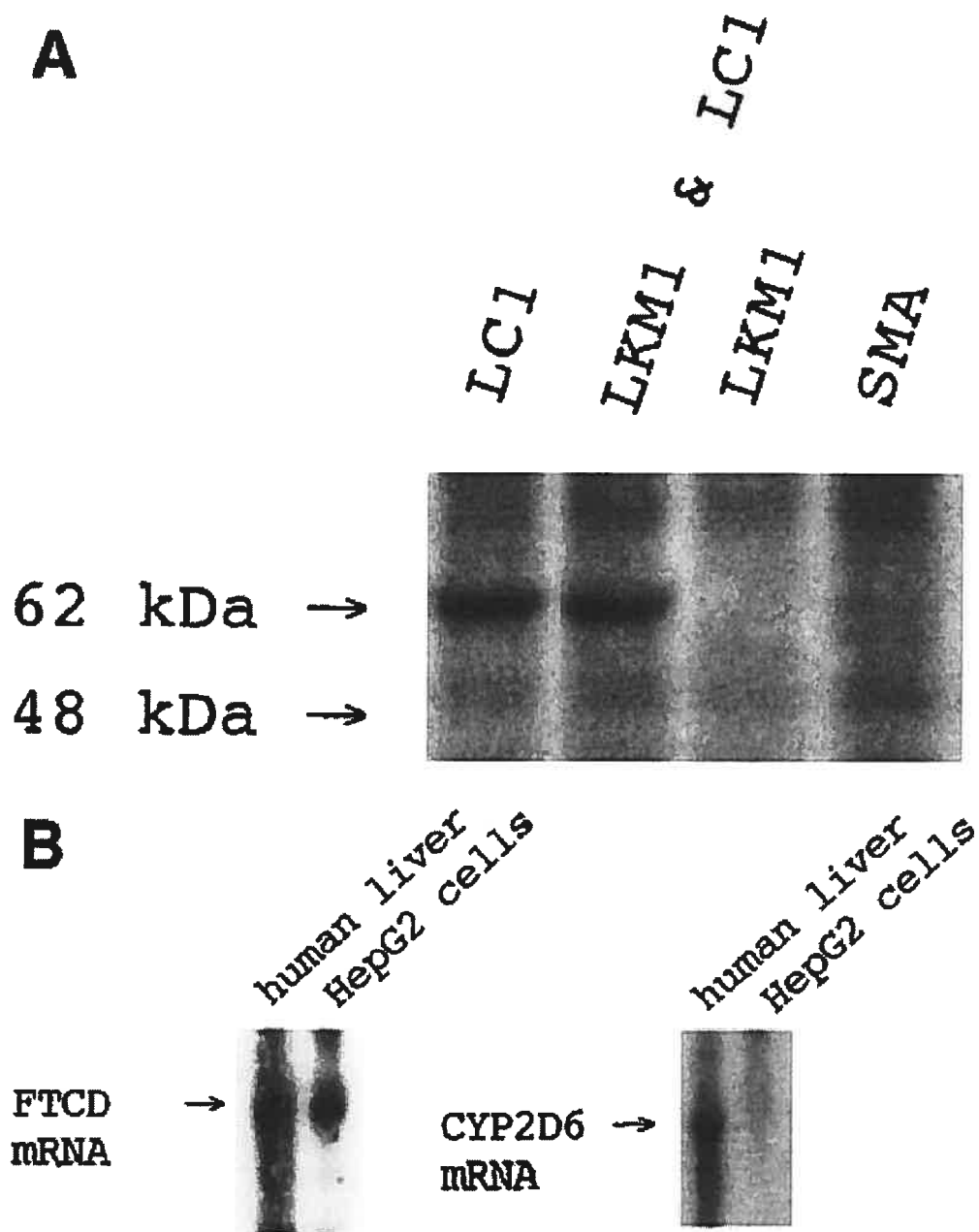


Figure 1: Human hepatoma HepG2 cell line expresses the LC1 antigen. A) a 62-kilodalton (kDa) in 10% SDS-PAGE is immunoprecipitated by anti-LC1 and LKM1/LC1 positive sera from (S^{35})cystein-labeled HepG2 proteins. The 48-kilodalton antigen specifically recognized by LKM1-positive sera is not present in the HepG2 cell line. B) Northern blot analysis shows that the LC1 antigen (FTCD) mRNA is present in human liver and HepG2 cells, but the LKM1 antigen (P450 2D6) is not found in HepG2 cells, confirming that the HepG2 cell line is a good model for identification of the LC1 antigen.

A

PTCD PIG	CCGCCCTTCCACGCGGCCTCAGCCAAGCTGACCTCGCTGGTGGACGCTGACGCCCGGGCC	1245
LCHC1	CCGCCCTTCCGCGAGGCTTCGGCCAAGCTAACCCACGCTGGTGGATGCCGACGCCGAGGCC	
PTCD PIG	TTTGAGGCCTACCTGAAAGCGATGAAGCTGCCCAAGGACACACCCGAGGACAAGGACAGG	1305
LCHC1	TTTACCGCCTACCTGGAAGCAATGAGGCTCCCAAGAACACACCTGAGGAAAAGGACAGG	
PTCD PIG	CGTGGCGCTGCCCTGCAGGAGGGGCTGAGGCAGGCAGTGGCTGTGCCCTGGCGCTGGCG	1365
LCHC1	CGCACGGCGGCCCTACAGGAGGCTCTGAGGCGGGCAGTCTCTGTGCCGCTGACGCTGGCG	
PTCD PIG	GAGACGGTGGCCTCGCTGTGGCCGGCACTGCAGGAGCTGGCCCTGTGTGGGAACCTGGCC	1425
LCHC1	GAGACGGTGGCCTCGCTGTGGCCGGCGCTGCAGGAACCTGGCCCGTGTGGGAACCTGGCC	
PTCD PIG	TGCCGATCTGACCTGCAGGTGGCAGCCAAGGCCCTGGAGACAGGTGTGTTTGGTGCCAT	1485
LCHC1	TGCCGGTCAGACCTCCAGGTGGCGGCCAAAGCCCTGGAGATGGCGGTGTTTGGCGCATAT	
PTCD PIG	TTCAACGTGCTCATCAACCTGAAAGATGTCACGGATGACGCGTTTAAGGCCAGGTCCGT	1545
LCHC1	TTCAACGTGCTCATCAACCTGAGGGACATCACAGACGAGGCATTTAAGGACCAGATCCAC	
PTCD PIG	CAGCGCATCTCCAGCCTCCTGCAGGAAGCCAAGACCCAGGCGGCACTGGTCTGGACCGG	1605
LCHC1	CATCGTGTTCAGCCTCCTGCAGGAAGCCAAGACCCAGGCTGCACTGGTCTGGACTGC	
PTCD PIG	CTGGAGGCCCCGGCAGGCGTGACGGCTGGAGGGGCACCTCCCTGGACCCCTGTCTTGCTGA	1665
LCHC1	TTGGAGACCCGGCAGGAGTGACGAAACCCAGGGACAGCAGGACCTTCGACCGCTGGAAGG	
PTCD PIG	GGCCCCCTCACTGTCTGGACGACAGGGTGGCCTCCAGACCTGTCTCTGGGGGCCCGGAGAG	1725
LCHC1	ATAGCCTCGCTTCCCAGGTGCAGCTCCCGGCAGGTCTGGACAGTTCCACAGAGCACGGTA	
PTCD PIG	GGCAGGGAGTGGGGGGCAAGGAAGGGGGGGCTCTGGGGGCAGTGGCATCACCTTCTGTCA	1785
LCHC1	CTGGCCCTGTCTCAGTTCCCGTCCACCCTTCAACCAGTGGCTCCTGGAGACTTTTCCTC	
PTCD PIG	CCTGTGGCTTCCAGTAAAGTGATGACACACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1838
LCHC1	CCTGCCTCAGCTCCCTGCCCAGCCAGCCTCCTGTCTCCAGAGAGTTCTCCATTAATAAAA	

B

PTCD pig	PPFHAASAKLTSLVDADARAPBAYLKAMKLPKDTPEKDRRAAALQEGLRQAVAVPLALA	455
LCHC1	PPPREASAKLTTLVDADABAPTAYLEAKRLPKNTPEKDRRTAALQEGLRRAVSVPLTLA	
PTCD pig	ETVASLWPALQELALCGNLACRSDLQVAAKALETGVPGAYPNVLI.NKDVTDDAFKAQVR	515
LCHC1	ETVASLWPALQELARCGNLACRSDLQVAAKALEMVPGAYPNVLI.NLRDITDEAFKQIH	
PTCD pig	QRISLLQBAKTQAALVLDRLRARQA	545
LCHC1	HRVSSLLQBAKTQAALVLDCLERQAE	

Figure 2: Similarities between the FTCD pig sequence and the LCHC1 sequence: (A) nucleotides and (B) amino acid sequences.

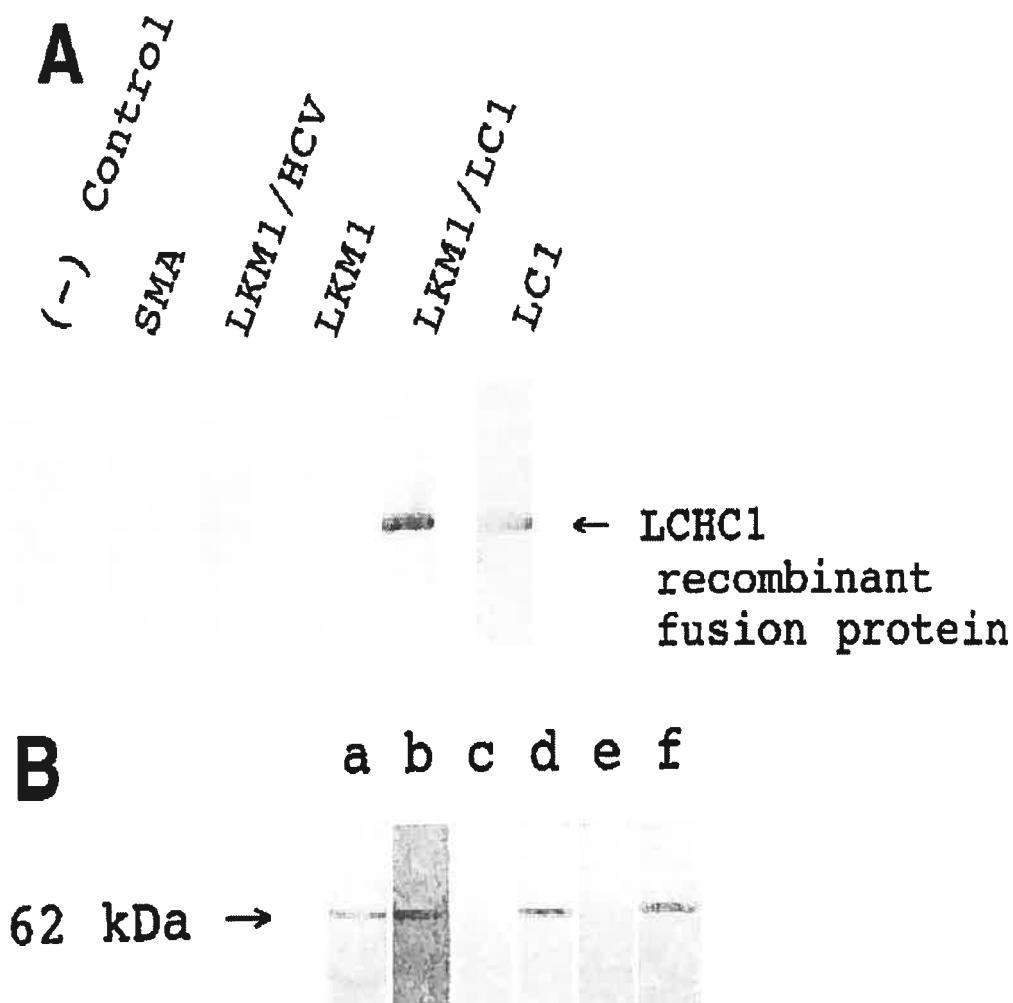


Figure 3: FTCD is the liver-specific antigen recognized by anti-LC1s. A) LCHC1 recombinant fusion protein test by immunoblot, containing the C-terminal region of human FTCD, is recognized only by LC1/LKM1 and anti-LC1 positive sera. In total, 20 anti-LC1 positive sera (alone or in association with LKM1s) recognize the LCHC1 recombinant fusion protein. B) Cross-reactivity between LCHC1 recombinant fusion protein and the human liver cytosol 62-kilodalton protein. The anti-FTCD affinity-purified antibodies (*lane b*) and the sera from mice immunized with the LCHC1 recombinant fusion protein react against a human liver 62-kilodalton cytosolic protein in an immunoblot assay. *Lane a*, anti-LC1-positive serum; *lane c*, anti-LC1-negative serum; *lanes d-f*, mouse sera

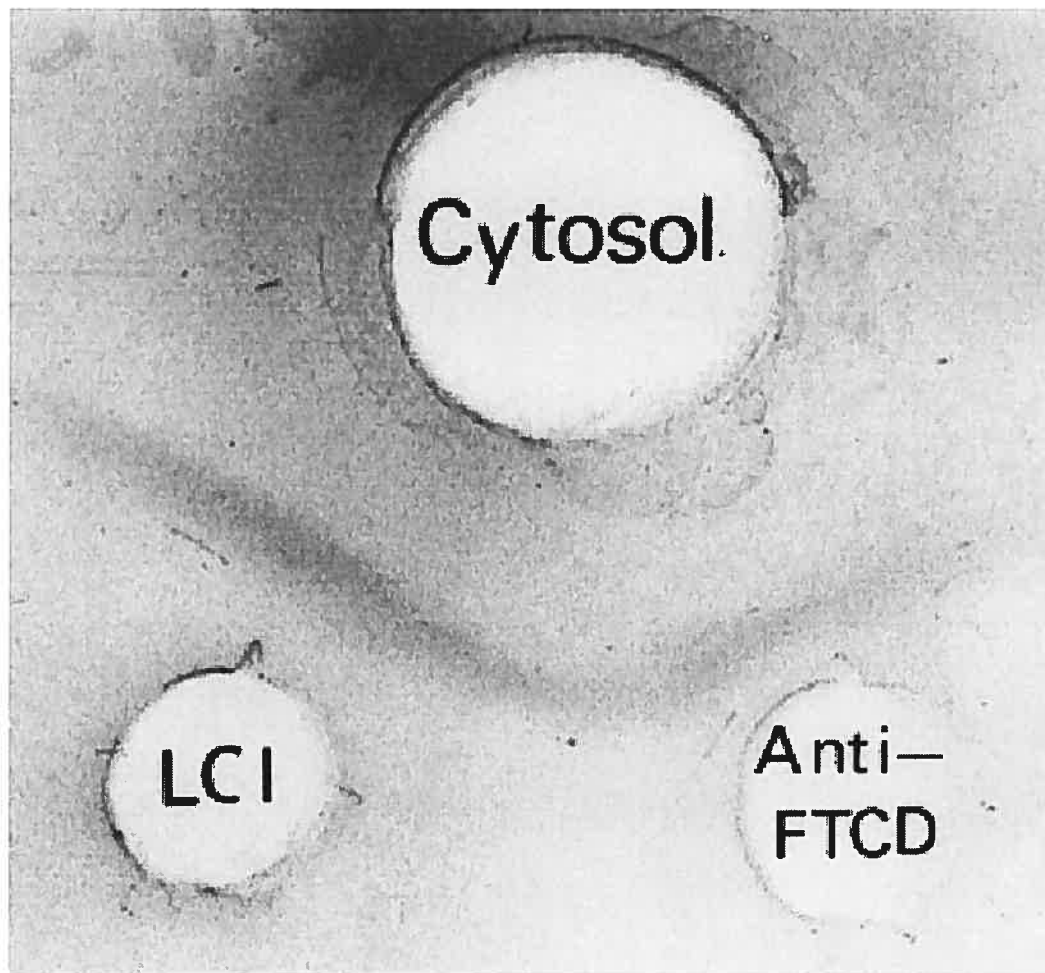


Figure 4: Ouchterlony double immunodiffusion method showing precipitation lines of identity between anti-LC1s and anti-pig FTCD polyclonal antibodies. Cytosol, liver cytosol subcellular fraction (2.5 mg); LC1: liver cytosol type 1 positive serum from a patient with AIH; Anti-pig FTCD: rabbit polyclonal anti-pig FTCD antibody (a gift of Dr. R.E. MacKenzie, McGill University, Montreal, Canada), that cross-react with human FTCD.

REFERENCES

1. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993;18:998-1005.
2. Homberg J-C, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil S, Poupon R, Darnis F, Levy NG, Gripon P, Opolon P, Bernuau J, Benhamou J-P, Alagille D. Chronic active hepatitis associated with anti liver/kidney microsome antibody type 1: A second type of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-1339.
3. Maggiore G, Weber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg J-C, Alvarez F, Hadchouel P, Alagille D. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1993;17:376-381.
4. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand J, Johanet C, Homberg J-C. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662-1666.
5. Han S, Tredger M, Gregorio GV, Mieli-Vergani G, Vergani D. Anti-liver antigen type 1 (LC1) antibodies in childhood autoimmune liver disease. *Hepatology* 1995;21:58-62.
6. Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Martini E, Soulier E, Laperche S, Homberg J-C. Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;16:892-898.
7. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi F B. Liver/Kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721-726.
8. Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans Ch, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnik N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL. Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nature Med.* 1996;2:1348-1353.
9. Ausubel FM, et al. *Current protocols in molecular biology* (John Wiley &

Sons, inc) 1995:4.2.4-4.2.5

10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning — A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 1989: 12.16-12.20.

11. Myachi K, Gupta TC, Dickson ER, et al. Precipitating antibodies to mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis. Clin Exp Immunol 1980;39:599-606.

12. Hurley LL, Mejia NR, MacKenzie RE. The nucleotide sequence of porcine formiminotransferase cyclodeaminase. J. Biol. Chem. 1993;268:22820-228.

13. Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989;159:542-547.

14. Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, Homberg J-C, Meyer U. Antibodies against human cytochrome P450 db1 in autoimmune hepatitis type II. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1988;27:8256-8260.

15. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450 db1. J. Clin. Invest. 1989;83:1066-1072.

16. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Manotti P, Lenzi M, Cassani F, Bianchi F B. Detection of anti-liver cytosol antibody type 1 (anti-LC1) by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting: comparison of different techniques. Journal of immunological Methods 1995;187:259-264.

17. MacKenzie RE, Aldridge M, Paquin J. The bifunctional enzyme formiminotransferase-cyclodeaminase is a tetramer of dimers. J. Biol. Chem. 1980;255:9474-9478.

Acknowledgments. This work was supported by a MRC grant to F.A. We would like to thank the advice and support from Prof. Claude Roy.

Chapitre III

Le récepteur des asialoglycoprotéines

A. Fonction et structure.

Le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) est responsable de la fixation et de l'élimination des glycoprotéines désialysées à partir de la circulation. Ce récepteur a été initialement découvert en 1968 par l'équipe de Morel et ses collaborateurs. En observant le métabolisme de la céruloplasmine chez le lapin, les auteurs ont observé que les résidus terminaux de l'acide sialique de la céruloplasmine sont des facteurs contrôlant la concentration de cette protéine dans la circulation. Cette étude a aussi montré que la disparition dans la circulation de l'asialocéruloplasmine marquée au ^{64}Cu est suivie par son apparition dans le foie. Au niveau de sections de foie, l'autoradiographie a révélé que les cellules parenchymateuses sont les sites privilégiés de dépôt de l'asialocéruloplasmine (Morel et coll, 1968). Les glycoprotéines sont formées d'unités glucidiques comprenant des résidus d'acide sialique en position terminale. Une fois les résidus d'acides sialiques éliminés par des sialylases situées à la surface des vaisseaux sanguins, les résidus galactose exposés de ces protéines sont détectés par le récepteur des asialoglycoprotéines. Le complexe formé de l'asialoglycoprotéine et de son récepteur est alors internalisé dans les cellules hépatiques par le processus d'endocytose. L'ASGP-R reconnaît le résidu terminal galactose ou N-acétylgalactosamine des asialoglycoprotéines (Ashwell et coll, 1982). L'internalisation des asialoglycoprotéines se fait à partir des puits ou des vésicules coatés à l'intérieur des hépatocytes. Approximativement 500 000 récepteurs sont présents à la surface basolatérale des hépatocytes différenciés et seulement 10% du pool cellulaire est exprimé à la surface cellulaire. Après internalisation, le complexe ligand-récepteur est dissocié et le récepteur est

recyclé à la surface cellulaire dans les trois-quatre minutes suivantes (Schwartz et coll, 1983).

L'hyperasialoglycoprotéïnémie observée chez les patients présentant un carcinome hépatique ou une cirrhose a été reliée à une diminution de l'activité de ASGP-R (Sawamura et coll, 1984). De plus, une accumulation des asialoglycoprotéines dans le sérum peut être expérimentalement induite suite à la lyse hépatocellulaire aiguë chez les rats traités à la galactosamine. Les résultats révèlent une corrélation entre l'accumulation des asialoglycoprotéines dans la circulation et une diminution de l'activité de l'ASGP-R (Sawamura et coll, 1991). L'ASGP-R a ainsi été proposé comme un régulateur physiologique du pool des glycoprotéines circulant. Toutefois, la participation fonctionnelle de ce récepteur dans l'homéostasie cellulaire nécessite d'autres investigations.

L'étude de la biosynthèse de l'ASGP-R humain a été effectuée dans les cellules HepG2. L'ASGP-R est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et est ensuite transporté à la membrane cellulaire en transitant par le Golgi. La protéine est synthétisée sous forme d'un précurseur de 40 kD, formée de deux chaînes oligosaccharidiques riches en mannose (Schawrtz et coll, 1983). Elle est convertie par la suite en un composé mature de 46 kD, résistant à l'endo-N-acétyl-glucosaminidase (endo-H). Le récepteur mature a une demi-vie de 30 heures durant laquelle il peut internaliser plus de 250 ligands. Une forme non glycosylée de la protéine de 34 kD est synthétisée en présence de la tunicamycine qui bloque la formation de l'oligosaccharide pyrophosphoryl-dolichol (Schawrtz et coll, 1983). Il a cependant été montré que l'absence ou une modification de la glycosylation du récepteur n'affecte ni le transport intracellulaire, ni l'activité de liaison ou l'endocytose de la protéine (Breitfeld et coll, 1984).

La protéine a été initialement solubilisée à partir de la membrane hépatique en utilisant le détergent Triton X-100 tout en conservant son activité de liaison (Morel et coll, 1974). Les propriétés physiques de ce récepteur ont été bien documentées. Ainsi, l'interaction entre les

asialoglycoprotéines et leur récepteur nécessite la présence des ions cationiques et un pH de l'ordre de 6 à 7.8. En se basant sur ces propriétés, une méthode d'isolation de l'ASGP-R a été mise au point, par chromatographie d'affinité, à partir d'une poudre acétonique de foie de lapin en utilisant l'asialofétuin ou le galactose comme substrat (Hudgin et coll, 1974). Deux sous-unités de 40 et 48 kD dans un ratio 2:1 ont alors été isolées à partir de foie de lapin (Kawasaki et coll, 1976). Par la suite, plusieurs techniques plus performantes ont été mises au point afin d'isoler la protéine chez diverses espèces en particulier le rat, la souris, le lapin et l'homme (Schwartz et coll, 1984). Dans le foie de rat, 3 sous-unités appelées "*rat hepatic lectins*" RHL-1, -2 et -3 ont été isolées et possèdent un poids moléculaire sur SDS-PAGE de 42, 49 et 54 kD respectivement (Drickamer et coll, 1984). De la même façon, trois sous-unités similaires ont été isolées à partir de foie de souris (Hong et coll, 1988). Par contre, chez le lapin et chez l'homme, l'ASGP-R est formé d'un complexe de deux sous-unités (Schawrtz et coll, 1984). Le récepteur a été caractérisé comme une glycoprotéine hydrosoluble contenant 10% de chaînes carbohydrates. Des études initiales n'ont permis de détecter qu'une sous-unité H1 de poids moléculaire de 46 kD dans le foie humain et dans les cellules HepG2. L'ADN complémentaire codant pour la sous-unité majeure H1 de l'ASGP-R humain a ensuite été cloné et séquencé à partir des cellules HepG2 (Spiess et coll, 1985). Le séquençage a révélé une certaine homologie de séquence d'acides aminés inter-espèce qui est de 79% avec la sous-unité majeure de rat (RHL-1), bien qu'il existe des différences dans des sites de glycosylation. Ainsi la sous-unité RHL-1 possède trois sites de glycosylation alors que la sous-unité H1 humain en possède deux. L'existence d'une deuxième sous-unité mineure H2 a été démontrée par la suite. Cette sous-unité H2 possède une séquence additionnelle de 18 acides aminés insérée au niveau du domaine cytoplasmique N-terminal et renferme ainsi un troisième site de glycosylation du côté C-terminal (Spiess et coll, 1985). Il existe deux sous-espèces de H2 (H2a et H2b) qui diffèrent par un résidu de 5 acides aminés

dans le domaine extracytoplasmique. La sous-unité mineure H2 a une homologie de séquence de 58% avec sous-unité majeure H1. Dans les cellules HepG2, la sous-unité H2 est synthétisée sous forme d'un précurseur de 43 kD riche en mannose, ce dernier étant converti par la suite en un polypeptide mature de 50 kD (Bischoff et coll, 1987). L'ASGP-R a donc été défini comme un complexe oligomérique formé des sous-unité H1 et H2. Chacune des sous-unités est glycosylée et renferme des ponts disulfures. L'ensemble du complexe est situé sur le côté sinusoïdal et latéral de la membrane des hépatocytes. Le récepteur traverse une seule fois la bicouche lipidique et contient un domaine N-terminal intracytoplasmique, un domaine transmembranaire et une portion C-terminale (Ashwell et coll, 1974). Cette dernière portion C-terminale glycosylée et exposée à la surface extra-cellulaire (plus de 80% de la molécule est exposée) pourrait être reconnue par les auto-anticorps circulants présents dans le sérum de patients atteints d'hépatopathies auto-immunes. La portion C-terminale constituée de 130-150 acides aminés est conservée à travers différentes espèces (80% d'homologie inter-espèces) (McPlaul and Berg, 1986).

B. Auto-anticorps dirigés contre l'ASGP-R

Chez les patients atteints d'HAI, les auto-anticorps circulants (SMA, ANA, LKM1) sont dirigés contre des auto-antigènes intracellulaires ou des composantes du cytosquelette (Manns et coll, 1989). Le rôle de ces auto-anticorps dans l'induction de la maladie n'est cependant pas clair. Cependant, ces auto-anticorps sont faciles à détecter et utiles au diagnostic. La présence d'auto-anticorps dirigés contre des auto-antigènes spécifiques de foie, pourrait être un marqueur des dommages des cellules hépatiques. D'autre part, ces auto-anticorps pourraient jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune, spécialement quand ils sont dirigés contre les auto-antigènes exposés sur la membrane des hépatocytes.

La préparation de lipoprotéines membranaires de foie ou (*liver specific proteins* ou *LSP*) est un des auto-antigènes spécifiques de foie. La LSP isolée à partir d'un homogénat de foie humain, contient un mélange hétérogène de protéines (Meyer zum Büschenfelde et coll, 1972, Hopf et coll, 1974). Une hépatite expérimentale a pu être induite chez des lapins immunisés à la LSP (Meyer et coll, 1972). De plus, les anticorps anti-LSP sont présents dans le sérum de patients atteints d'HAI et le titre de ces anticorps est corrélé avec la sévérité de la nécrose hépatocytaire (Jensen et coll, 1978). Une augmentation des taux d'anticorps anti-LSP faisant suite à une diminution du traitement laisse généralement présager une rechute dans les semaines ou les mois à venir (McFarlane et coll, 1984). Enfin, des immunoglobulines de type IgG fixés sur les membranes plasmiques d'hépatocytes ont été trouvées dans les biopsies hépatiques de patients atteints d'HAI (Hopf et coll, 1974; Mc Farlane et coll, 1988; Vogten et coll, 1978, Kakumu et coll, 1979 et Manns et coll, 1980). Ces anticorps anti-LSP ne sont pas spécifiques de la maladie et peuvent également être présents dans le sérum de patients présentant une cirrhose biliaire primitive, une hépatite aiguë à virus B ou une hépatite alcoolique. La LSP est une préparation très hétérogène contenant plusieurs antigènes. De telle sorte qu'il est difficile d'interpréter les résultats puisque les auto-anticorps anti-LSP sont probablement dirigés contre de nombreux antigènes (Porolla et coll, 1987). L'équipe de McFarlane a été la première à identifier l'ASGP-R comme une composante de la LSP. Tout d'abord, ce récepteur a été purifié à partir de foie humain et de lapin. Ses caractéristiques antigéniques ont été testées par RIA et ELISA en utilisant les anticorps anti-LSP. Des cochons d'inde ont pu être immunisés avec la LSP purifiée à partir de foie humain et de lapin et les résultats ont montré que les anticorps anti-LPS réagissent fortement avec l'ASGP-R. Cette réactivité peut être abolie par une pré-absorption d'anticorps anti-LSP avec la LSP ou la protéine ASGP-R et non avec l'homogénat de rein. Ces résultats ont permis d'identifier l'ASGP-R comme un composant du LSP (McFarlane et coll, 1984). Par la suite, il a été

démonstré que l'ASGP-R est un auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LSP provenant de patients atteints d'hépatopathies auto-immunes (McFarlane et coll, 1985; Treichel et coll, 1990). Chez le rat, le foie a été perfusé *in situ* par des anticorps polyclonaux anti-ASGP-R et la distribution de ces anticorps a été examinée en immunohistochimie sur des coupes de tissus. Les résultats ont montré que les anticorps anti-ASGP-R se fixent sur les cellules hépatiques de la région péri-portale et produisent une hépatite d'interface (McFarlane et coll, 1990). Depuis, la recherche d'anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients atteints d'hépatopathies auto-immunes s'est intensifiée à travers plusieurs approches. Tout d'abord, McFarlane et ses collaborateurs (1986) ont révélé la présence d'anticorps anti-ASGP-R par dosage radioimmunologique (RIA) en utilisant comme antigène la protéine purifiée à partir de foie de lapin. Les anti-ASGP-R ont alors été détectés dans le sérum de 83% de patients atteints d'HAI, le titre de ces auto-anticorps semble être relié à l'activité inflammatoire de la maladie en se basant sur l'examen histologique de biopsies de foie de ces patients. Ainsi, les 10 patients en rémission de cette étude ne présentent plus d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans leur sérum (voir tableau 4). Les anticorps anti-ASGP-R sont présents chez 35% de patients atteints d'hépatite à virus B et chez 22% de patients atteints de CBP (McFarlane et coll, 1986). Un autre groupe de patients, constitué de 412 patients atteints d'hépatopathies auto-immunes et 288 patients présentant d'autres pathologies extra-hépatiques, a été étudié selon la technique d'ELISA en utilisant l'ASGP-R purifié à partir de foie humain, de rat et de lapin comme auto-antigène. La présence d'auto-anticorps dirigés contre l'ASGP-R humain était fortement élevée dans le sérum de patients atteints d'HAI (50%), en particulier pour ceux présentant une activité inflammatoire très importante (88%). Seulement 4 à 15% de patients atteints d'autres hépatopathies (CBP, hépatites virales, hépatites alcooliques) présentent des auto-anticorps dirigés contre l'ASGP-R humain. D'autre part, la présence d'anticorps dirigés contre l'ASGP-R purifié à partir de foie de rat et de lapin, est beaucoup plus fréquente chez

les patients atteints d'hépatopathies non reliée à l'HAI (tels CBP, Hépatites virales et alcooliques). Cette présence est surtout reliée à l'activité inflammatoire et non à l'étiologie de la maladie. Les auteurs suggèrent que la présence de ces anticorps peut être le résultat d'un mécanisme non spécifique de la maladie, telle qu'une activation polyclonale des cellules B, alors que des auto-anticorps dirigés contre le récepteur humain sont étroitement liés à l'HAI. Le titre et la classe d'immunoglobuline sont également reliés à l'activité de la maladie. Ainsi, les anticorps anti-ASGP-R de type IgM sont restreints à la période d'activité sévère de l'HAI et disparaissent après un traitement immunosuppresseur. Chez les patients traités, les anti-ASGP-R sont d'isotype IgG2. Par contre dans le cas de l'hépatite virale, les anticorps anti-ASGP-R sont de type IgG4, ont un titre faible, et il n'y a plus de corrélation avec l'activité de la maladie (Treichel et coll, 1990 et 1993).

C. La réponse cellulaire dirigée contre le récepteur des asialoglycoprotéines.

Très peu d'études ont été effectuées sur l'immunité cellulaire dirigée contre l'ASGP-R. Dans des études effectuées par Lohr et ses collaborateurs, des lymphocytes du sang périphérique (*peripheral blood lymphocytes, PBL*) ont montré *in vitro* une réponse proliférative en présence de l'ASGP-R humain. Cette réponse proliférative a été observée chez 37% de patients atteints d'HAI et 33% de patients atteints de CBP. Elle est restreinte aux molécules HLA puisqu'elle est bloquée par des anticorps monoclonal anti-HLA. Aucune prolifération n'a par contre été observée chez les patients atteints d'hépatites chroniques virales. Seuls les PBL isolés à partir de patients atteints d'HAI étaient capables de sécréter *in vitro* des anticorps anti-ASGP-R. Des clones de cellules T ont été isolés à partir de biopsies de foie de 3 patients (2 avec CBP et 1 avec HAI) (Lohr et coll, 1990, 1992). Ces clones reconnaissent l'ASGP-R présenté par des cellules B autologues sous restriction de la molécule HLA classe II et

avaient la capacité d'induire *in vitro* la sécrétion d'auto-anticorps anti-ASGP-R par des cellules B autologues. Des lymphocytes T spécifiques à ASGP-R ont également été détectés dans les infiltrats de lymphocytes intra-hépatiques, indiquant que ces cellules T locales pourraient jouer un rôle dans l'induction de la réponse immune spécifique dirigée contre l'ASGP-R. La plupart de ces cellules T sont des CD4⁺ (Lohr et coll, 1990, 1992; Treichel, et coll, 1992). Tous ces résultats ont montré que le récepteur des asialoglycoprotéines est un bon candidat pour expliquer la pathogénese de l'hépatite auto-immune. Le récepteur possède plusieurs caractéristiques:

- * C'est une protéine spécifique du foie;
- * Du fait de sa localisation extracellulaire, le récepteur peut être exposé aux auto-anticorps circulants;
- * La présence d'auto-anticorps dirigés contre la protéine isolée à partir de foie humain, est préférentiellement reliée à l'HAI;
- * Le titre élevé et la classe d'Immunoglobuline de ces anticorps anti-ASGP-R humain sont liés à l'activité inflammatoire de la maladie;
- * Après perfusion de foie de rat par des anticorps anti-ASGP-R, ces derniers se fixent sur les cellules hépatiques situées dans la région péri-portale, et produisent une hépatite d'interface;

Ces études ont été effectuées sur des patients adultes. Le but de notre étude était donc :

- a) de détecter la présence d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients pédiatriques atteints d'HAI de type 1 et 2.
- b) d'analyser une éventuelle corrélation entre les données cliniques et biochimiques.
- c) de localiser et de caractériser le site antigénique du récepteur des asialoglycoprotéines reconnus par les anti-ASGP-R présents dans le sérum de patients atteints d'HAI.

Tableau 4: Fréquence d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients adultes atteints d'HAI selon différentes méthodes.

	Anti-ASGP-R (purifié à partir du foie humain)		Anti-ASGP-R (purifié à partir du foie de lapin)			Anti-ASGP-R rat
	ELISA	EIA	ELISA	RIA	RIFA	
HAI *avec une activité inflammatoire intense	88%(15/17) ^(a)	88% ^(b)	42% (7/17) ^(a)	83%(15/18) ^(c)	-	59% (10/17) ^(a) 67% (14/21) ^(e)
* en rémission	50%(44/88) ^(a)	50% ^(b)	27% (24/87) ^(a)	0% (0/10) ^(c)	-	40% (35/88) ^(a)
HAI de type1 (SMA/ANA)	82% (18/22) ^(a)				82%(44/54) ^(d)	
HAI de type 2 (LKM1/LC1)	66% (4/6) ^(a)					

ELISA: Enzyme-linked immunoabsorbent assay; RIA: radioimmunoassay;
EIA: solid-phase enzyme immunoassay; RIFA: radioimmunofiltration assay

(a) Treichel et coll, 1990 et 1993

(b) Porolla et coll, 1991

(c) McFarlane et coll, 1986

(d) Czaja et coll, 1996

(e) Yoshioka M et coll, 2002.

D. Détection d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum d'enfants atteints d'hépatites auto-immunes.

Résumé de l'article: Auto-antibodies to the asialoglycoprotein receptor in sera of children with auto-immune hepatitis. Oumnia Hajoui*, Dominique Debray[#], Steven Martin*, Fernando Alvarez*. Eur J Pediatr (2000) 159: 310-313.

Les enfants atteints d'hépatite auto-immune peuvent être séparés en deux groupes selon le type d'auto-anticorps circulants : l'HAI de type 1 caractérisée par la présence d'auto-anticorps SMA et/ou ANA et l'HAI de type 2 caractérisée par la présence d'auto-anticorps anti-LKM1 et/ou LC1 (Johnson et coll, 1993; Martini et coll, 1988). Le rôle pathologique de ces auto-anticorps n'est pas encore établi. Des auto-anticorps anti-ASGP-R ont été trouvés dans le sérum chez 50% à 88% de patients atteints d'HAI (Treichel et coll, 1990 et 1993). La plupart de ces études ont été effectuées chez des sujets adultes atteints d'HAI de type 1 et une seule étude a été réalisée chez un nombre restreint de patients pédiatriques (Gregorio et coll, 1997). Le but de ce travail était de détecter la présence d'auto-anticorps anti-ASGP-R dans les sérums d'enfants atteints d'HAI et d'analyser la corrélation entre les données cliniques et biochimiques. L'ASGP-R a été isolé à partir du foie d'un donneur humain sain. Cette protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'agarose couplée au lactose. L'ASGP-R a ensuite été utilisé pour développer un test ELISA. Dans cette étude, un groupe de 63 patients atteints d'HAI de type 1 et 2 ont été testés par dosage ELISA pour détecter la présence sérique d'anticorps anti-ASGP-R. Ces sérums ont été prélevés préalablement à tout traitement immunosuppresseur. Ils ont été analysés en immunofluorescence indirecte pour la présence d'auto-anticorps (SMA, ANA, LKM1 et LC1). De plus, les sérums LKM1 positifs ont été testés en Western-blot et ont reconnu la protéine de 48kD sur microsomes de foie humain et la protéine recombinante CYP2D6; Les sérums LC1 positifs ont par contre reconnu en

Western-blot la protéine cytosolique FTCD. Tous les sérums de patients étaient cependant HCV et HVB négatifs. Des sérums de donneurs sains et de sujets atteints d'autres hépatopathies auto-immunes ont été utilisés comme contrôles.

Les enfants atteints d'HAI de type 2 sont caractérisés par une prédominance féminine particulièrement marquée (89% de femmes versus 71%) et par un âge moyen significativement inférieur (7.6 ans versus 12.3 ans, $P=0.0001$), par comparaison aux enfants atteints d'HAI de type 1. Par contre, les sérums d'enfants atteints d'HAI de type 1 sont caractérisés par une hypergammaglobulinémie (37.17 ± 3.4 g/l versus 26.34 ± 2.28 g/l; $P=0.0042$) et un taux d'aminotransférase plus élevé (20.2 ± 3.0 fois la valeur normale versus 13.3 ± 2.46 ; $P=0.03$) comparé aux sérums d'enfants atteints d'HAI de type 2.

La fréquence de présence d'anticorps anti-ASGP-R est plus élevée dans le sérum d'enfants atteints d'HAI de type 1 (75%) comparés aux enfants atteints d'HAI de type 2 (40%). De la même façon, le titre de ces auto-anticorps est plus élevé dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 1 (1/1600 versus 1/1000). Il n'y a aucune différence significative entre les sérums de patients anti-ASGP-R positifs et les patients anti-ASGP-R négatifs concernant l'âge moyen de patient, le taux d'aminotransférase et le ratio F/H. Par contre, une forte corrélation a été trouvée entre le titre d'auto-anticorps anti-ASGP-R et l'hypergammaglobulinémie, et ceci pourrait être associé à une activité inflammatoire plus élevée. Des études antérieures avaient en effet montré la corrélation entre le titre des auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients adultes atteints d'HAI de type 1 et l'activité inflammatoire. Après un traitement aux immunosuppresseurs, le titre et la fréquence de ces auto-anticorps anti-ASGP-R diminuent dans le sérum de patients adultes atteints d'HAI (Treichel et coll, 1990).

**Auto-antibodies to the asialoglycoprotein receptor in sera of children
with auto-immune hepatitis**

Authors: Oumnia Hajoui*, Dominique Debray[#], Steven Martin*, Fernando Alvarez*. Eur J Pediatr (2000) 159: 310-313.

*Service de Gastro-entérologie, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Canada.

[#]Service d'Hépatologie Pédiatrique, Hôpital de Bicêtre, Bicêtre, France.

Correspondance: F. Alvarez, M.D., Service de Gastroentérologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175, Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, H3T 1C5 Canada.

Tel: (514) 345-4626

Fax: (514) 345-4999

Abstract

Most studies on the prevalence of asialoglycoprotein antibodies have involved adults. In the study the prevalence of antibodies to the human asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) was determined in 63 children with auto-immune hepatitis. It was shown that 75% of those with auto-immune hepatitis type 1 and 40% of those with auto-immune hepatitis type 2 were positive and the presence of anti-ASGP-R auto-antibodies, at a mean titre of 1:1,600 and 1:1,000 respectively. No statistical significance was found between anti-ASGP-R positive and negative patients with respect to the median age at onset, proportion of females and ATL levels. However, the titre of anti-ASGP-R antibodies correlated significantly with hypergammaglobulinaemia.

Conclusion Anti-asialoglycoprotein receptor antibodies are frequently present in the sera of children with auto-immune hepatitis, particularly type 1. The presence of these antibodies is an indirect marker of inflammatory activity.

Key words Asialoglycoprotein receptor. LKM antibodies. ELISA. Auto-immune hepatitis type 1 and 2. Hypergammaglobulinaemia.

Abbreviations AIH auto-immune hepatitis. ANA anti-nuclear antibody. ASGP-R asialoglycoprotein receptor. LC1 liver-cytosol type 1 antibody. LKM1 liver-kidney microsome type 1 antibody. SMA smooth muscle antibody

Introduction

Autoimmune hepatitis (AIH) has a peak incidence in childhood (4,6) and is classified into two types based upon the type of circulating auto-antibodies: type 1, when smooth muscle antibodies (SMA) and/or antinuclear antibodies (ANA) are present and type 2, when liver-kidney microsome type 1 (LKM1) and/or liver-cytosol type 1 (LC1) antibodies are found (5,8). The role of these auto-antibodies in the pathogenesis of the disease is controversial, as both are directed against intracellular antigens (6). In sera from patients with AIH, an auto-antibody against a liver membrane preparation was found to specifically recognize the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) (9). Most studies on the prevalence of ASGP-R auto-antibodies have involved adult patients with AIH type 1 (1,10), although a small number of children have studied in one report (2). The aim of this study was to establish the prevalence of anti-ASGP-R antibodies in untreated children with AIH types 1 and 2 and to correlate the results with clinical and laboratory data.

Patients and Methods

A total of 63 children from the Hôpital de Bicêtre and the Hôpital Sainte-Justine, all considered to have a "probable" or "definitive" diagnostic of AIH according to the criteria of the International Group for the Study of Auto-immune Hepatitis, were studied prior to the treatment (5). Sera taken from 28 children with AIH type 1 and from 35 children with AIH type 2 were examined for the presence of auto-antibodies (SMA, ANA, LKM1 and LC1) by indirect immunofluorescence. All LC1 positive sera recognized the formimino transferase cyclodeaminase antigen (9). Those sera positive for LKM1 auto-antibodies were confirmed by Western blot analysis against human liver microsomal proteins and recombinant cytochrome P450 2D6 and for LC1 antibodies by Western blot against liver cytosol proteins. All sera had previously been found negative for hepatitis B

surface antigen and negative for antibody to HCV by second generation ELISA.

The ELISA test, using purified human ASGP-R as antigen, was carried out as previously described (3). A sample was considered positive when the measured optical density (OD) at 405 nm was > 0.12 , which was the maximal value obtained with 15 normal sera as well as 23 disease controls with a median age 8 years (range 2-17 years) (HCV/LKM1+, $n=11$; HCV/LKM1-, $n=3$, biliary atresia, $n=15$, Amerindian cirrhosis, $n=4$, byler syndrome, $n=5$; non A, non B, non C hepatitis, $n=2$; auto-immune polyglandular syndrome, $n=2$; bone marrow/liver transplant, $n=2$, cystic fibrosis, $n=2$). An individual serum titer was defined as the last dilution for which the value of OD was > 0.12 .

Statistical analysis.

The Student's t-test was used to compare differences in the means of continuous variables. Fisher's exact test was used to compare dichotomous variables and the Mann-Whitney test to compare non-parametric variables in independent samples. The correlation coefficient (r) expressed the determination of the correlation between two mutually dependent variables.

Results

The 63 children studied were classified as follows: AIH type 1: 28 children SMA and/or ANA positive; AIH type 2: 35 children LKM1 and/or LC1 positive. Of the 28 children with AIH type 1, 8 were positive for SMA alone (titre range 1:200-1:1,000), 20 for both ANA (titre range 1:20-1:5,200) and SMA (titre range 1:50-1:10,000). All 35 children with AIH type 2 were LKM1 positive (titre range 1:100-1:100,000); 9 of these patients (26%) were also LC1 positive.

Patients with AIH type 2 were significantly younger than those with AIH type 1 (median age 7.6 years, range 2.3-14.8 years vs 12.3 years, range 2.7-19.2 years $P=0.0001$), had lower aminotransferase (13.3 ± 2.46 vs 20.2 ± 3.0

times the upper limit of normal, $P=0.03$), lower gammaglobulin levels (26.35 ± 2.28 g/l vs 37.17 ± 3.4 g/l, $P=0.0042$) and involved a higher percentage of females (89% vs 71%, $P=0.0003$).

Of the 63 sera, 35 (56%) were anti-ASGP-R positive by ELISA. Mean titres of anti-ASGP-R autoantibodies as well as O.D. obtained with sera at a 1:100 dilution were not significantly different between both types of AIH ($1:1600 \pm 800$ vs $1:1000 \pm 400$). In contrast, the frequency of ASGP-R-positive sera was higher in-patients with AIH type 1 (75%) than in type 2 (40%). No differences in age and percentage of female patients were observed between anti-ASGP-R positive and negative patients. However, higher gammaglobulin levels (34.9 g/l ± 2.93 versus 26.5 g/l ± 2.67) were found in anti-ASGP-R positive patients (table 1) and the titres of anti-ASGP-R antibodies showed a positive correlation with the serum gammaglobulin levels (Figure 1).

Discussion

The hypothesis that anti-ASGP-R autoantibodies might play a role on the pathogenesis of AIH is supported by the observation that the receptor is localized at the sinusoidal membrane of the hepatocytes, therefore representing a potential target for circulating auto-antibodies (10). Anti-ASGP-R antibodies are more frequently found in sera from adult with AIH with severe inflammatory activity (11,15) and bind preferentially to the periportal hepatocytes (12) possibly explaining the characteristic « piecemeal » necrosis observed in the liver biopsies from patients with AIH. ASGP-R do not appear to be preferentially located in the periportal region but rather in the centrolobular region (16); however, anti-ASGP-R antibodies may also preferentially bind to periportal hepatocytes in vivo given that antibodies in the portal inflow initially come into contact with periportal hepatocytes. Anti-ASGP-R antibodies are not disease-specific and are detectable in adult patients with other acute and chronic liver diseases (11, 13). However, the incidence and titres of auto-antibodies are lower than

those observed in sera from patients with AIH (11, 13) and the antibody response is more often non-human epitope specific (7).

In this study, anti-ASGP-R antibodies were detected in 56% of children with AIH. In children with AIH type 1, 75% were positive, a prevalence similar to that observed in adults with active disease (15). In contrast, only 40% of children with AIH type 2 were anti-ASGP-R positive, this difference in prevalence possibly related to differences in the pathogenesis of AIH types 1 and 2. In a smaller group of children ASGP-R antibodies were previously detected in only 30% of 28 patients with AIH (5/21; 24% with AIH type 1, 4/7; 57% with AIH type 2), a study in which rabbit ASGP-R was used as antigen in the assay system (2). Antibodies to non-species-specific epitopes of ASGP-R were shown to be less specific for AIH (7). In adults with AIH and elevated inflammatory activity, 88% were anti-human ASGP-R positive (14). This may explain the higher prevalence in the present study in which human ASGP-r was used as antigen.

No differences according to age and sex were observed between ASGP-R positive and negative children, in contrast to those occurring with SMA and LKM1 antibodies in AIH types 1 and 2 (2,7). Anti-ASGP-R antibodies may be associated with more active inflammatory process. The B-lymphocyte activation observed in patients with AIH is considered to reflect the inflammatory activity and anti-ASGP-R antibody positivity correlates with serum gammaglobulin levels in adults with AIH type 1 (1). Following immunosuppressive treatment, the anti-ASGP-R autoantibody titres decrease rapidly (7) such that less 50% of adult patients with AIH in remission are anti-ASGP-R positive (7, 11, 15). In this study, we did not obtain the histological inflammatory grade but we also found a positive correlation between anti-ASGP-R titres and gammaglobulin levels. A prospective study of children with AIH would help to determine whether the presence of ASGP-R antibodies correlates with histological inflammatory activity, the presence of piecemeal necrosis and a particular disease course or outcome.

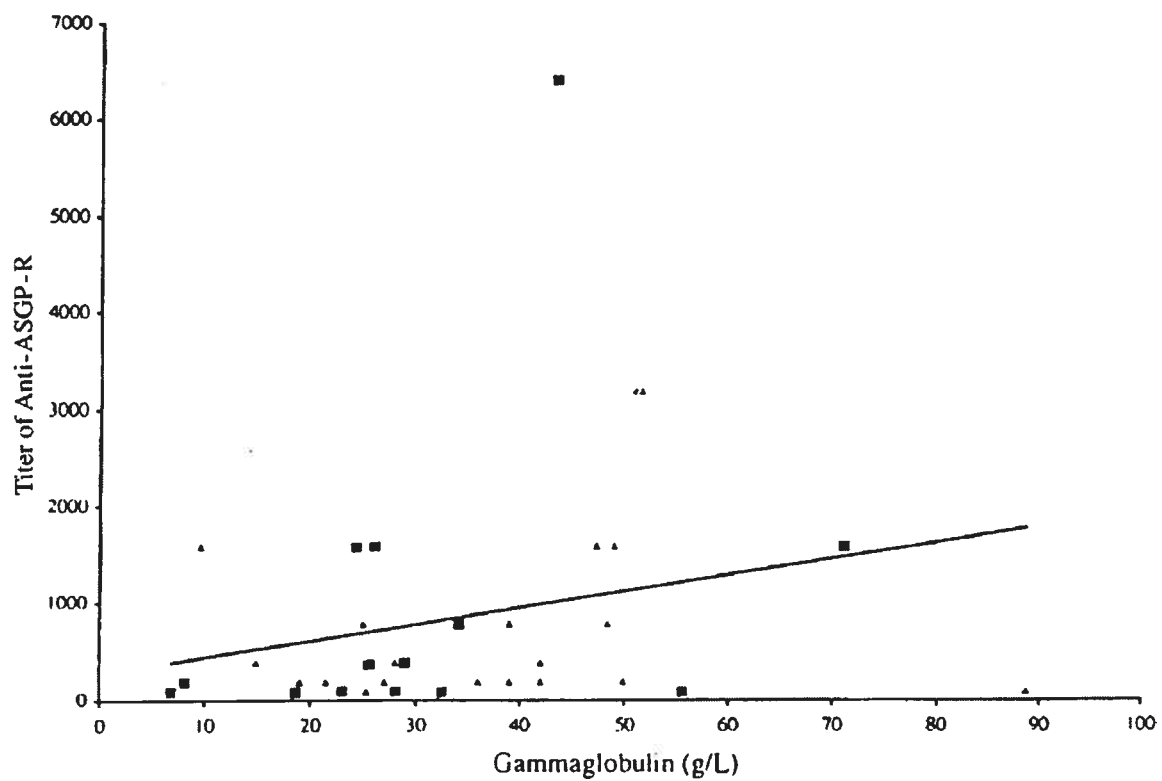


Figure 1. Correlation between ASGP-R antibody titers and serum gammaglobulin concentration. ν = AIH type 1, σ = AIH type 2

Table 1. Clinical and laboratory findings in ASGP-R positive and ASGP-R negative children with AIH (NS not significant)

Patients	Anti-ASGP-R negative n=28	Anti-ASGP-R positive n=35	P
Age			
Median	10 years, 2 months	10 years, 2 months	NS
Range	2years,8months to14years,9months	10 years, 3 months to19 years,9 months	
Females (%)	21/28 (75%)	30/35 (86%)	NS
AIH type 1 (n=28)			
ANA/SMA positive (%)	7 (25%)	21 (75%)	
ASGP-R titre (mean \pm SE)		1:1600 \pm 800	0.0054 ^a
AIH type 2 (n=35)			
LKM1 positive (%)	21 (60%)	14 (40%)	
ASGP-R titre (mean \pm SE)		1:1000 \pm 400	0.05 ^a
Gammaglobulins (g/l)	26.5 \pm 2.67	34.9 \pm 2.93	0.02 ^b
(mean \pm SE)			
ALT (x normal) (mean \pm SE)	13.68 \pm 2.36	18.53 \pm 2.94	NS

^a Fisher's exact test^b Student *t* test

References

1. Czaja AJ, Pfeiffer KD, Decker RH, Vallari AS (1996) Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 41: 1733-40
2. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, et al. (1997) Autoimmune hepatitis in childhood: a 20 years experience. *Hepatology* 25: 541-7.
3. Hajoui O, Martin S, Alvarez F (1998) Study of antigenic sites on the asialoglycoprotein receptor recognized by autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 113:339-346
4. Homberg J-C, Abuaf N, Bernard O, et al. (1987) Chronic active hepatitis associated with anti-liver/kidney microsome antibody type 1: A second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 7:1333-9.
5. Johnson PJ, Mc Farlane IG (1993) Meeting report. International autoimmune hepatitis group. *Hepatology* 18: 998-1005.
6. Maggiore G, Alvarez F, Bernard O (1993) Autoimmune chronic hepatitis. In: Buts J-P, Sokal EM (eds) *Management of digestive and liver disorders in infants and children*. Elsevier, Amsterdam, pp 567-75.
7. Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg J-C, Alvarez F, Hadchouel P, Alagille D (1993) Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 17: 376-81.
8. Martini E, Abuaf, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg J-C (1988) Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 8:1662-1666.
9. Lapierre P, Hajoui O, Homberg J-C, Alvarez F (1999) Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 116:643-649.
10. Mc Farlane IG, Mc Farlane BM, Major GN, Tolley P, Williams R (1984) Identification of the hepatic asialoglycoprotein receptor (hepatic lectin) as a

component of liver specific membrane lipoprotein (LPS). Clin Exp Immunol 55: 347-54.

11. Mc Farlane BM, Mc Sorley CG, Vergani D, Mc Farlane IG, Williams R (1986) Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. J Hepatol 3: 196-205.

12. Mc Farlane BM, Spos J, Gove CD, Mc Farlane IG, Williams R (1990) Antibodies against the hepatic asialoglycoprotein receptor perfused *in situ* preferentially attach to periportal liver cells in the rat. Hepatology 11; 408-15.6. 13. Meyer zum Büschenfelde KH, Treichel U, Löhr H, Fleischer B, Poralla T (1991) Human asialoglycoprotein receptor as an autoantigen in chronic hepatitis. Immunol Res 10: 497-502.

14. Treichel U, Gerken G, Rossol S, Rotthauwe HW, Meyer zum Büschenfelde, Poralla T (1993) Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: Effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis. J Hepatol 19: 55-63.

15. Treichel U, Poralla Th, Hess G, Manns M, Meyer zum Büschenfelde K-H (1990) Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. Hepatology 11:606-12.

16. Van der Sluijs P, Braakman I, Meijer D, Groothuis G (1988) Heterogeneous acinar localization of asialoglycoprotein internalization system in rat hepatocytes. Hepatology 8:1521-1529

Acknowledgments: we would like to thank Prof. J-C Homberg for the indirect immunofluorescence testing of patient's sera.

E. Caractérisation des sites antigéniques de l'ASGP-R reconnu par les auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients atteints d'hépatites auto-immunes.

Résumé de l'article: STUDY OF ANTIGENIC SITES ON THE ASIALOGLYCOPROTEIN RECEPTOR RECOGNIZED BY AUTOANTIBODIES. Oumnia Hajoui, Steven Martin, Fernando Alvarez. Clin Exp Immunol. 113(3) :339-45, 1998 sep.

Le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) est une glycoprotéine transmembranaire, située sur le côté sinusoïdal de la membrane des hépatocytes. Ce récepteur est un complexe hétéro-oligomérique formé de deux sous-unités H1 et H2. Chacune de ces sous-unités est glycosylée et renferme des ponts disulfures. Des anticorps dirigés contre ASGP-R sont présents dans le sérum de patients atteints d'HAI (Treichel et coll, 1993). Du fait de sa localisation extracellulaire, ce récepteur pourrait être exposé aux auto-anticorps circulants qui seraient alors responsables potentiellement de la lyse cellulaire.

Le but de cette étude est de localiser et de caractériser l'épitope de l'ASGP-R reconnu par les auto-anticorps anti-ASGP-R présents dans le sérum de patients atteints d'hépatites auto-immunes.

Méthodologie : L'ASGP-R a été isolé à partir du foie d'un donneur humain sain. Cette protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'agarose couplée au lactose. La protéine isolée a alors été testée sous sa forme native en ELISA et en Slot-blot. Ces deux techniques permettaient de détecter les auto-anticorps anti-ASGP-R dirigés contre la protéine native présents dans le sérum de patients atteints d'HAI. Nous avons analysé un groupe de 26 patients atteints d'HAI de type 1 et 36 patients atteints d'HAI de type 2. Par la suite, la protéine a été testée sous sa forme dénaturée en Western-blot pour détecter les auto-anticorps anti-ASGP-R dirigés contre les sites linéaires. Un lapin a été immunisé contre la

séquence peptidique linéaire de la sous-unité H1, et ce sérum nous a servi de contrôle positif. Plusieurs traitements ont ensuite été effectués sur la protéine pour caractériser les sites antigéniques reconnus par les auto-anticorps anti-ASGP-R. L'expression endogène de l'ASGP-R a été étudiée dans les cellules HepG2. Ces cellules ont été mises en culture et traitées avec divers inhibiteurs, la tunicamycine, la bréfeldine et la monensine. La tunicamycine bloque la formation de l'oligosaccharide pyrophosphoryl dolichol et inhibe ainsi la glycosylation des protéines dans le réticulum endoplasmique (R.E). La bréfeldine bloque le transport des protéines du R.E vers l'appareil de Golgi. Quant à la monensine, elle est utilisée comme un agent qui perturbe le transport des protéines. Dans les cellules traitées à la monensine, les protéines sont accumulées dans les vacuoles dérivées du complexe golgien, et les modifications post-traductionnelles, tels la glycosylation terminale et le clivage protéolytique, sont bloquées. Le récepteur traité et non traité a été testé en immunoprécipitation pour détecter la présence d'auto-anticorps anti-ASGP-R dirigés contre les différentes formes synthétisées à partir des cellules HepG2. La protéine purifiée à partir de foie, a été marquée à l'iode et traitée à l'Endoglycosydase F et au β -mercaptoéthanol. Par la suite, elle a été testée en immunoprécipitation sous sa forme native. Pour détecter la présence éventuelle d'auto-anticorps anti-ASGP-R contre le site de liaison du récepteur, l'ASGP-R a été lié à son ligand asialofetuin (ASF) et immunoprécipité par la suite en utilisant les auto-anticorps anti-ASGP-R.

L'ASGP-R purifié à partir de foie humain a un poids moléculaire entre compris entre 46 et 48 kD sur un gel dénaturant d'acrylamide SDS-PAGE (figure 2). Les auto-anticorps anti-ASGP-R sont présents dans le sérum de 44.5% de patients atteints d'HAI de type 2 et de 65.4% de patients atteints d'HAI de type 1 (figure 1). Les mêmes sérums reconnaissent la protéine isolée à partir du foie et testée sous sa forme native en Slot-blot. Par contre, ces auto-anticorps anti-ASGP-R ne la reconnaissent pas sous sa forme dénaturée en Western-blot. Donc, nous pouvons conclure que le site

antigénique reconnu par les auto-anticorps anti-ASGP-R n'est pas une séquence linéaire du récepteur. Le sérum de lapin dirigé contre la séquence peptidique linéaire de la sous-unité H1 reconnaît la protéine purifiée à partir de foie humain aussi bien sous sa forme native (en slot-blot et en ELISA) que sous sa forme dénaturée en Western-blot (figure 3).

En ce qui concerne l'expression endogène du récepteur dans les cellules HepG2, le sérum de lapin a été utilisé pour l'immunoprécipitation de la protéine; Les cellules non traitées expriment la protéine ayant un poids moléculaire de 46 kD. Après un traitement des cellules par la tunicamycine, la protéine exprimée est non glycosylée et de poids moléculaire de 34 kD. Les cellules traitées par la monensine et la bréfeldine expriment une protéine non mature de 40 kD (figure 4). Les auto-anticorps anti-ASGP-R présents dans le sérum de patients atteints d'HAI et testés en ELISA, ne précipitent pas la protéine exprimée dans les cellules HepG2. Ces auto-anticorps réagissent par contre avec la protéine marquée à l'iode et purifiée à partir de foie humain (figure 5). Puisque les auto-anticorps anti-ASGP-R ne réagissaient pas avec la protéine exprimée par les cellules HepG2, ces cellules exprimaient probablement, une protéine différente de celle isolée à partir du foie humain, Cette différence pourrait être liée aux chaînes de carbohydrates. Ainsi, la déglycosylation de l'ASGP-R isolé à partir de foie par l'endoglycosydase F, diminue notablement la capacité de formation de complexe immun entre les anticorps et la protéine mature (figure 7). Par contre, la rupture des ponts disulfures de la molécule après traitement par le β -mercaptoéthanol, ne modifie pas sa reconnaissance par les anticorps. Après liaison du récepteur des asialoglycoprotéines à son ligand ASF, les auto-anticorps anti-ASGP-R reconnaissent toujours ce complexe, suggérant que les sites antigéniques de l'ASGP-R reconnu par les auto-anticorps ne sont pas situés au site de liaison à son ligand.

Dans le sérum de patients atteints d'HAI, les auto-anticorps anti-ASGP-R sont dirigés contre des **sites antigéniques conformationnels** de la structure hétéro-oligomérique de la protéine mature isolée à partir de foie

humain. Les chaînes des carbohydrates exposées sur le domaine extracellulaire de la membrane des hépatocytes font partie des épitopes et sont accessibles aux auto-anticorps circulants. Cette conclusion apporte des arguments pour suggérer un rôle pour les auto-anticorps anti-ASGP-R dans la pathogenèse de l'HAI.

**STUDY OF ANTIGENIC SITES ON THE ASIALOGLYCOPROTEIN
RECEPTOR RECOGNIZED BY AUTOANTIBODIES**

Oumnia Hajoui, Steven Martin, Fernando Alvarez. Clin Exp Immunol.
113(3) :339-45, 1998 Sep.

Service de Gastroentérologie, Hôpital Sainte-Justine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

Short title: Epitopes on the asialoglycoprotein receptor.

Key words:Autoantibodies. Asialoglycoprotein receptor. Autoimmune
Hepatitis. Antigenic sites.

Correspondence: Fernando Alvarez, M.D., Service de
Gastroentérologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte
Ste-Catherine, Montreal, Quebec H3T 1C5.

E-mail: [REDACTED]

Tel.: (514) 345-4626, **Fax:** (514) 345-4999

Summary

The aim of this study was to identify the epitopes recognized by antibodies to the asialoglycoprotein receptor, a specific hepatocyte protein, from sera of patients with autoimmune hepatitis. An ELISA test was used to detect anti-asialoglycoprotein receptor antibodies in the sera of patients with autoimmune hepatitis. Positive sera were tested against the same antigen by slot blot, by Western blot and by immunoprecipitation of the untreated protein and following treatment with β -mercaptoethanol (β -ME) and endoglycosidase F. The mature, unglycosylated and partially glycosylated forms of the asialoglycoprotein receptor synthesized by HepG2 cells were tested against positive patients' sera, as well as the *in vitro* translated unglycosylated form of the H₁ subunit of the receptor. Sera from patients with autoimmune hepatitis recognized equally the native form, as well as the β -ME-modified form, but less well the deglycosylated form of the human mature receptor. No reactivity was found when these sera were tested against the denatured human protein. In addition, neither the unglycosylated H₁ subunit nor any of HepG2-synthesized asialoglycoprotein receptor forms bound to the antibodies. Altogether, these results show that anti-asialoglycoprotein receptor antibodies in the sera of patients with autoimmune hepatitis are directed against conformational structures of the mature hetero-oligomeric form of the human liver protein and that at least some epitopes were located on the extracellular domain of the antigen.

Introduction

Liver-specific antigens exposed on the hepatocyte cell surface may play a role in the pathogenesis of autoimmune hepatitis (AIH). The asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) is an integral membrane protein of the sinusoidal domain of the hepatocyte plasma membrane. This hetero-oligomeric glycoprotein is mainly exposed on the extracellular side of the cell membrane and is readily accessible to circulating antibodies [1]. Autoantibodies against the ASGP-R were frequently found in sera from patients with different types of AIH [2-4]. Higher titres of these antibodies were found before the beginning of immunosuppressive treatment [3] and they identified patients with a higher frequency of relapse after corticosteroid withdrawal [5]. Anti-ASGP-R antibodies were shown to be mainly bound to periportal hepatocytes when infused into the rat portal vein [6]. These findings might explain the predominance of periportal inflammation observed in patients with active AIH [6]. Altogether, these arguments lead to the speculation that anti-ASGP-R autoantibodies might play a role in the pathogenesis of the AIH.

While anti-ASGP-R antibodies have also been found in other liver diseases, such as acute and chronic viral hepatitis, reactivity to human ASGP-R was more specifically associated with AIH [2]. Although differences in epitope specificity may explain these differences in reactivity, the epitopes on the protein recognized by anti-ASGP-R antibodies from AIH patients, however, have not yet been identified. The study of the characteristics of the interaction between ASGP-R and autoantibodies by identification of the antigen epitopes might help to understand the generation of the autoimmune response. If these ASGP-R epitopes are located in the extracellular domain of the protein, a new argument may be developed to support the hypothesis that anti-ASGP-R antibodies might be responsible for the hepatocyte damage. The asialoglycoprotein receptor is composed of two subunits designated H₁ and H₂. Each subunit is glycosylated and possesses

intramolecular disulfide bridges which contribute to its conformational structure [1]. In order to identify the ASGP-R epitopes, antibodies recognizing the human ASGP-R were tested against the mature, the unglycosylated and partially glycosylated protein synthesized by normal human liver and by HepG2 cells. Asialofoetuin (ASF) was bound to the mature ASGP-R to test for modification of the putative antigenic sites by the binding of a specific ligand. The ASGP-R was treated by β -mercaptoethanol (β -ME) to disrupt intramolecular disulfide bridges that might be necessary for the constitution of an epitope. Finally, the unglycosylated H₁ subunit of the receptor was synthesized *in vitro* and tested against the anti-ASGP-R autoantibodies.

Material and Methods

Purification of the ASGP-R

Human liver (50-100 mg) was obtained from the right lobe of a brain dead donor from whom only the left lobe was transplanted. ASGP-R was purified according to the protocol described by Hudgin *et al* [7], with some modifications. An acetone powder was prepared by homogenization of liver tissue in cold acetone (4 ml/g of tissue). The powder was washed with 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 200 mM NaCl and resuspended in 1% Triton X-100, and the pH was then adjusted to 7.8 with 1M Tris-Cl and CaCl₂ added to a final concentration of 0.02 M. The suspension was subjected to affinity chromatography using lactose-agarose beads [8]. ASGP-R was eluted using 40 mM ammonium acetate pH 6 buffer. The protein concentration was measured by the method described by Lowry *et al.* [9], and the purity of the protein assessed by SDS (10%)-PAGE.

Sera

Sera from 26 children with AIH type 1 and from 36 children with AIH type 2 were tested by ELISA for anti-ASGP-R antibodies. The sera were obtained before beginning immunosuppressive treatment in these patients. Criteria used for diagnosis of AIH were those described by the International Autoimmune Hepatitis Group [11]. Ten normal control sera were used to define non-specific binding. Two positive control sera were used; one was a rabbit polyclonal antibody against a peptide sequence of the C-terminal region of the H₁ subunit of the ASGP-R (kindly provided by H. Lodish, MIT), and the other a human serum tested positive for anti-ASGP-R by solid phase enzyme immunoassay elsewhere (kindly provided by M. Manns, Hannover).

ELISA test for anti-ASGP-R

Purified human ASGP-R was diluted to a final concentration of 1 µg/ml of PBS pH 7.4 and 100 µl of this solution was placed in each well of a 96-well polyvinyl plate, and then dried overnight at 60°C. Blocking, incubations, washing and development were made as described [12]. Sera dilutions tested were between 1:100 and 1:6,400. The ELISA test was considered positive when the optical density (OD) measured was more than twice the mean value for OD of the 10 control sera. An individual serum titre was defined as the last dilution for which the value for OD was positive.

Slot blot and Western blot analysis

Purified ASGP-R was loaded on a 10% SDS-PAGE and then transferred to a nitrocellulose filter [13], or applied directly to a nitrocellulose paper using a slot blot apparatus. ASGP-R (1 µg) was loaded on each SDS-PAGE lane or on each well for slot blot. Blocking, incubations, washing and development were made as previously described [14]. Dilutions used were of 1:100 for patients, normal sera and human positive control serum. Rabbit polyclonal antibody was used at a dilution of 1:1000.

HepG2 cell culture and labelling

HepG2 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD), and maintained in minimum essential medium (MEM) containing Earle's salts, non-essential amino acids, glutamine, 10% fetal calf serum (FCS) and streptomycin/penicillin. Cultures were made in six-well plates and maintained at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. For labelling, cells (approximately 1×10^6) were rinsed with PBS and incubated for 30 minutes at 37°C with MEM without cysteine. Later, this medium was replaced by fresh MEM with 200 $\mu\text{Ci/ml}$ of S³⁵-cysteine and cells were maintained at 37°C for another 30 minutes. Pulse-chase was made by replacing the radioactive medium by MEM with unlabelled cysteine at 500 times higher concentration than the radioactive amino acid. Incubation was continued for 90 minutes at 37°C. To avoid glycosylation of the ASGP-R, HepG2 cells were incubated with tunicamycin at a final concentration of 3 $\mu\text{g/ml}$ in MEM, for 6 h before and during the pulse and chase periods [15]. To inhibit transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus and maturation of the ASGP-R, brefeldin and monensin were used at concentrations of 18 μM and 2 μM respectively. Incubations with these drugs were made for 1 h before and during pulse and chase periods [15]. At the end of these periods, cells were resuspended in 500 μl of the following buffer: 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40. The ASGP-R was then immunoprecipitated from the suspension (see below).

¹²⁵I labeling of purified ASGP-R

Preparation of the ¹²⁵I-labelled ASGP-R was made by the chloramine-T method [10]. Specific activity of ¹²⁵I-labelled ASGP-R was between 3.4 and 6.7×10^3 cpm/ μg of protein. The ¹²⁵I labelled ASGP-R was subjected to electrophoretic analysis in a 10% SDS-PAGE, to show the purity of the isolated protein [Figure 2].

In vitro transcription and translation of H1 subunit of ASGP-R

The cDNA in the pGEM coding for the H1 subunit of ASGP-R (kindly provided by H. Lodish, MIT) was transcribed and translated in vitro using the Riboprobe system (SP6) and rabbit reticulocyte lysate (nuclease free) kits following the instructions from the manufacturer, Promega (Madison, USA). The translated protein was immunoprecipitated as described below. Yields of 3 to 6 μg of RNA/ μg of linearized plasmid DNA were obtained. In vitro translation of 2 μg of ASGP-R subunit H1 RNA was made in presence of 10 mCi/ml of (^{35}S) Methionine.

Immunoprecipitation of ASGP-R

Immunoprecipitation of ASGP-R was made from 200 μl of HepG2 cell suspension and from 1.2×10^6 cpm of the ^{125}I labelled protein, diluted with 4 volumes of 190 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 6 mM EDTA and 2.5% Triton X-100. Two μl of human serum were added to the immunoprecipitation test tube, and the samples were incubated at 4°C overnight. Sera used in the immunoprecipitation reaction were those positive by ELISA at titers between 1:400 and 1:800. Negative and positive controls were described previously. Immunocomplexes were precipitated by adding protein A-Sepharose (20 μl of swollen beads) to the solution and incubating 2 hours at room temperature. The immunoprecipitate was analyzed by 10% SDS-PAGE and fluorography. The film obtained was scanned in an UltroScan SL-Laser densitometer apparatus from Pharmacia-LKB (Bromma, Sweden), and the area under each peak compared between rabbit serum and sera from patients with AIH. The same procedure was used to immunoprecipitate the H1 subunit translated in-vitro.

In order to determine whether occupation of the ASGP-R by the specific ligand ASFO modifies recognition of the receptor by antibody, immunoprecipitations were carried out with 0.1 μg of ^{125}I labelled or unlabelled ASFO. In other experiments modifications of ASGP-R were made prior to

immunoprecipitation. Dissociation of disulfide bridges was achieved by incubating 0.1 µg of ^{125}I -ASGP-R with 5 mM β -mercaptoethanol [β -ME] for 10 minutes at room temperature, followed by evaporation of free β -ME. Deglycosylated receptor was prepared by incubating 0.1 µg of ASGP-R with 2,500 U of endoglycosidase F from New England Biolabs (Ontario, Canada) which cleaves between the innermost (Glc NAc) and asparagine residues of high mannose, hybrid and complex oligosaccharides from N-linked glycoproteins. In these experiments the cpm from immunoprecipitated untreated or treated ASGP-R was measured in the gamma counter before loading on the electrophoresis gel.

Results

ELISA test

The ELISA test was positive in 65.4% and 44.5% of sera from children with AIH type 1 and 2, respectively. Mean titers of positive sera were 1:500 (range 1:100 - 1:1,600) for AIH type 1 and 1:800 (range 1:100 - > 1:6,400) for AIH type 2. Rabbit serum titers were > 1:6,400. The O.D. median [range] and mean [\pm SD] obtained with anti-ASGP-R positive sera from patients with AIH (type 1 and 2 combined) are represented in Figure 1a and b respectively. Individual O.D. are represented in Figure 1c.

Slot blot and Western blot analysis

The purified ASGP-R showed a molecular mass of 46-48 kD in 10% SDS-PAGE (Figure 2). All of the sera positive by ELISA test recognized the native form of the protein when tested by slot blot (Figure 3). None of them, however, recognized the ASGP-R denatured form in Western blot analysis as carried out in our laboratory and at the dilutions used in this study (Figure 3).

Immunoprecipitation of the ASGP-R from HepG2 cells

None of the sera from patients with AIH immunoprecipitated the ASGP-R in its native form as synthesized by HepG2 cells (Figure 4). This negative result was observed when sera were tested against the mature protein (from untreated cells), the unglycosylated protein cells treated with tunicamycin, and the partially glycosylated forms (cells treated with brefeldin and monensin) (results not shown). These different forms of the ASGP-R, however, were immunoprecipitated by the rabbit polyclonal antibody against a linear epitope of the H1 subunit of the protein. The mature protein of 46 KD as well as a partially glycosylated form were immunoprecipitated from untreated cells. The unglycosylated form of the H1 subunit (34 KD) was immunoprecipitated from cells treated with tunicamycin. A partially glycosylated protein (40 KD) was immunoprecipitated from brefeldin and monensin treated cells. The bands observed when solubilized radioactively labelled untreated and drug treated HepG2 proteins were immunoprecipitated by LKM1 or SMA were considered as non-specific because the same bands appeared whether anti-ASGP-R positive or negative sera were used. In addition, the band appearing at 38-40 KD in the LKM1+ samples were considered to be non-specific since this band remained unaltered after tunicamycin treatment and did not correspond with the bands immunoprecipitated by rabbit serum.

Immunoprecipitation of the H1 subunit

None of the sera from AIH patients, that recognized the ASGP-R in slot blot and ELISA tests, immunoprecipitated the H1 subunit of the receptor (results not shown).

Immunoprecipitation of ^{125}I labelled ASGP-R

All the sera from AIH patient immunoprecipitated the ^{125}I labelled ASGP-R purified from human liver in its native form (Figure 5). The relative

amounts of the labelled ASGP-R immunoprecipitated by the rabbit antibody are greater than that immunoprecipitated by the sera from AIH patients. This result was also observed when a positive control serum from an adult patient with AIH was tested (Figure 4). Results of film scanning showed that between 6.6 and 33.3 times more 125 I ASGP-R was immunoprecipitated by each μ l of rabbit serum than for each μ l of anti-ASGP-R positive AIH patients' sera.

Occupation of ASGP-R by the specific ligand ASFO did not alter the capacity of human antibody against the ASGP-R to recognize the antigen (Figure 6). Pretreatment of ASGP-R with β -ME decreased by half the amount of receptor immunoprecipitated by the rabbit anti-ASGP-R serum (Figure 7, lanes b and c), but slightly increased the amount immunoprecipitated by anti-ASGP-R serum from the AIH patient (Figure 7, lanes e and f). In contrast, AIH patient serum immunoprecipitated a lower amount of labelled ASGP-R (1.2×10^4 cpm) when it was treated with endoglycosidase F before incubation with the serum (Figure 7, lane g).

Discussion

The anti-ASGP-R immune response in patients with AIH may explain the hepatocyte lysis observed in this disease, especially in cells located in the peri-portal region [6]. A more precise knowledge of ASGP-R epitopes could lead to a better understanding of the mechanisms responsible for the generation of this specific B-cell response and may bring new light on the possible pathogenic role of anti-ASGP-R in the inflammatory destruction of the liver observed in patients with AIH.

An ELISA test was set up using well characterized negative and positive control sera. This test using purified human ASGP-R detected the presence of antibodies against this protein in the sera of patients with AIH type 1 and 2. These results were confirmed by slot-blot analysis, where the protein was

also tested in its native form. However, when both subunits of the protein were submitted to an electrophoresis in a SDS-PAGE and tested in denatured form by Western blot, no reactivity was observed with any of the sera, under the conditions used in this study (Figure 2). Subsequently sera were tested for reactivity against the native forms of each subunit and the mature form of the receptor. Two models were used: a) the in-vitro synthesis of the H₁ subunit; and b) the protein forms at different steps of their biosynthetic pathway in HepG2 cells. In both models immunoprecipitation of radioactive labelled ASGP-R was performed due its greater sensitivity than Western blot analysis. The ASGP-R is a hetero-oligomeric molecule and its formation requires the association of the H₁ and the H₂ subunits [1, 16, 17]. The H₁ subunit synthesized in human liver has a faster electrophoretic mobility than this subunit in HepG2 cells. Because the peptide sequence is the same in both cellular types, this difference is most probably due to the carbohydrate chains [16]. More importantly, the ratio of H₁ and H₂ subunits in the mature heteromeric ASGP-R is different in human liver and HepG2 cells [16]. In this study several methods were used to modify the structure of the receptor in order to determine which are the components critical for its recognition by circulating antibodies. The unglycosylated H₁ subunit alone, synthesized in vitro from the cDNA, or the unglycosylated H₁ and H₂ subunits, synthesized by the HepG2 cells treated with tunicamycin, were not immunoprecipitated by anti-ASGP-R positive sera; showing that a partial or complete glycosylation may be necessary for the reaction of the anti-ASGP-R with the protein. In addition, none of the sera tested recognized the ASGP-R from HepG2 cells, either in its partially glycosylated form (brefeldin and monensin treated cells) or in its mature form probably because of the characteristics of the carbohydrate chains. Although, one might propose that the particular H₁/H₂ ratio in the ASGP-R from HepG2 cells modified putative conformational epitope(s), from our findings we speculate that the conformation of the heteromeric molecule and the carbohydrate chains

could be part of conformational epitopes on the ASGP-R against which the autoimmune response has been directed.

The only proof from these results that AIH patients' sera react with the human ASGP-R were the ELISA and the slot blot tests. These techniques, however, do not definitively exclude a cross reactivity against a non-specific contaminant undetected by methods used to determine the purity of the protein preparation. The ASGP-R preparation was labelled with ^{125}I and analyzed in a 10% SDS-PAGE (Figure 7). Rabbit anti-ASGP-R and AIH patients' sera immunoprecipitated a protein of the same size (Figure 5). The relative amount of ^{125}I labelled human liver ASGP-R immunoprecipitated by AIH patients' sera was lower than those immunoprecipitated by the rabbit serum. Higher titers of anti-ASGP-R antibodies in rabbit serum than in AIH patients' sera might explain these differences.

Having determined that: a) anti-ASGP-R antibodies present in the sera of patients with AIH are mainly directed against conformational epitopes; b) that hetero-oligomeric complexes in the mature form are necessary for recognition of the ASGP-R by the autoantibodies; and c) that carbohydrate chains probably form part of the epitope site(s), further experiments were performed to confirm these results and to determine whether the ligand binding site forms part of the epitope and whether a modification of mature human ASGP-R conformational structure affects recognition by anti-ASGP-R antibodies. After binding of the specific ligand asialofoetuin, anti-ASGP-R antibodies still recognize the receptor suggesting that most epitopes recognized by anti ASGP-R antibodies are located outside the ligand binding site. Modification of conformational structure by β -ME treatment did not conclusively alter antibody recognition of the receptor (Figure 7). However, deglycosylation of the human mature receptor reduced the binding of ASGP-R antibodies (Figure 7g) suggesting that carbohydrate chains located in the extracellular domain of ASGP-R form at least part of the epitopes. The lack of a similar reduction following endoglycosidase treatment when testing with

rabbit anti ASGP-R serum is not surprising given that this antibody is directed to a peptide sequence in the C-terminal region of the ASGP-R. In conclusion, this work shows that ASGP-R antibodies in sera of patients with AIH are directed against conformational epitopes of the mature hetero-oligomeric form of the human receptor and that at least some of the epitopes are located on the extracellular domain of the antigen and are readily accessible to circulating autoantibodies.

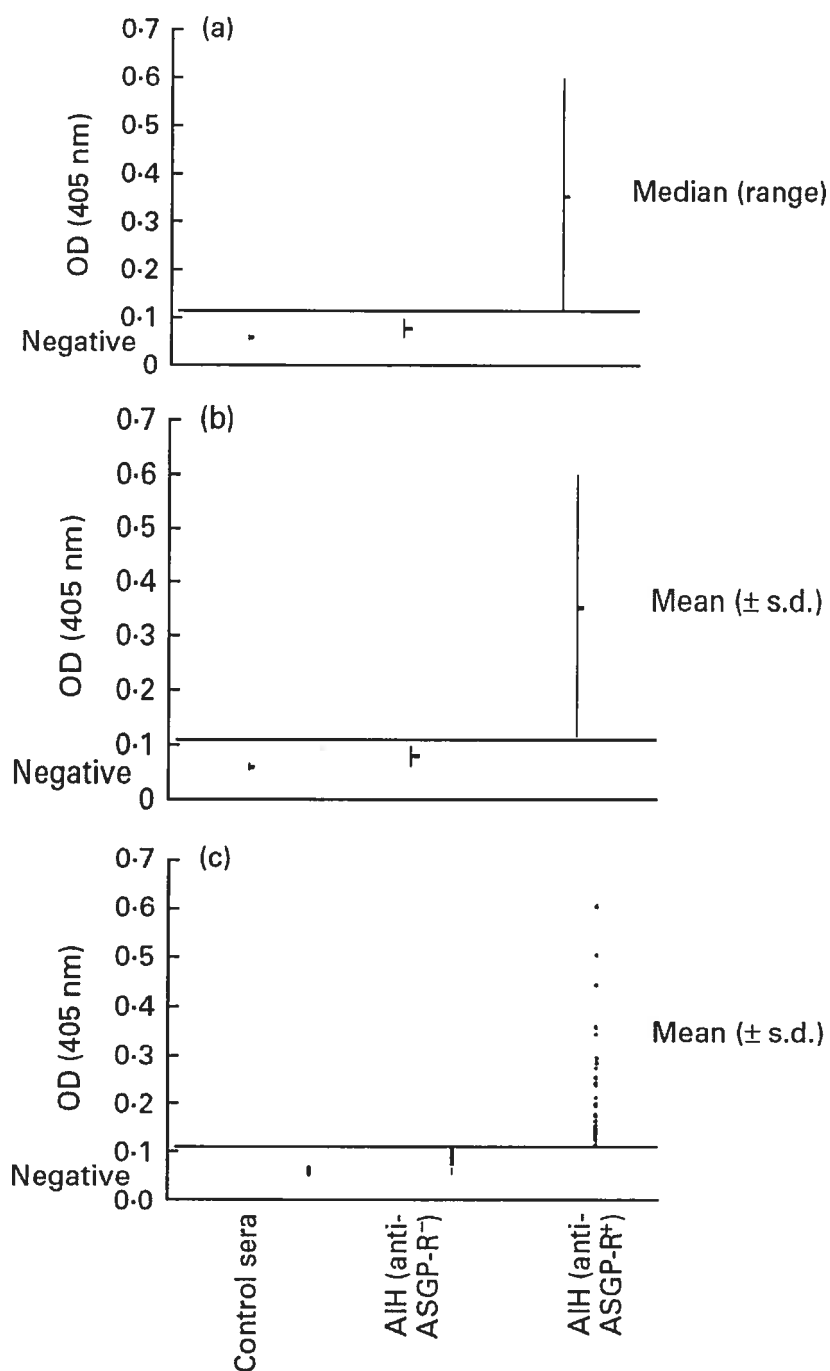


Figure 1. Results of ELISA tests using as an antigen purified human ASGP-R. Sera from AIH patients and controls represented in this figure were diluted 1:100. a) median (range); b) mean (\pm SD); and c) individual measurements of O.D. obtained.

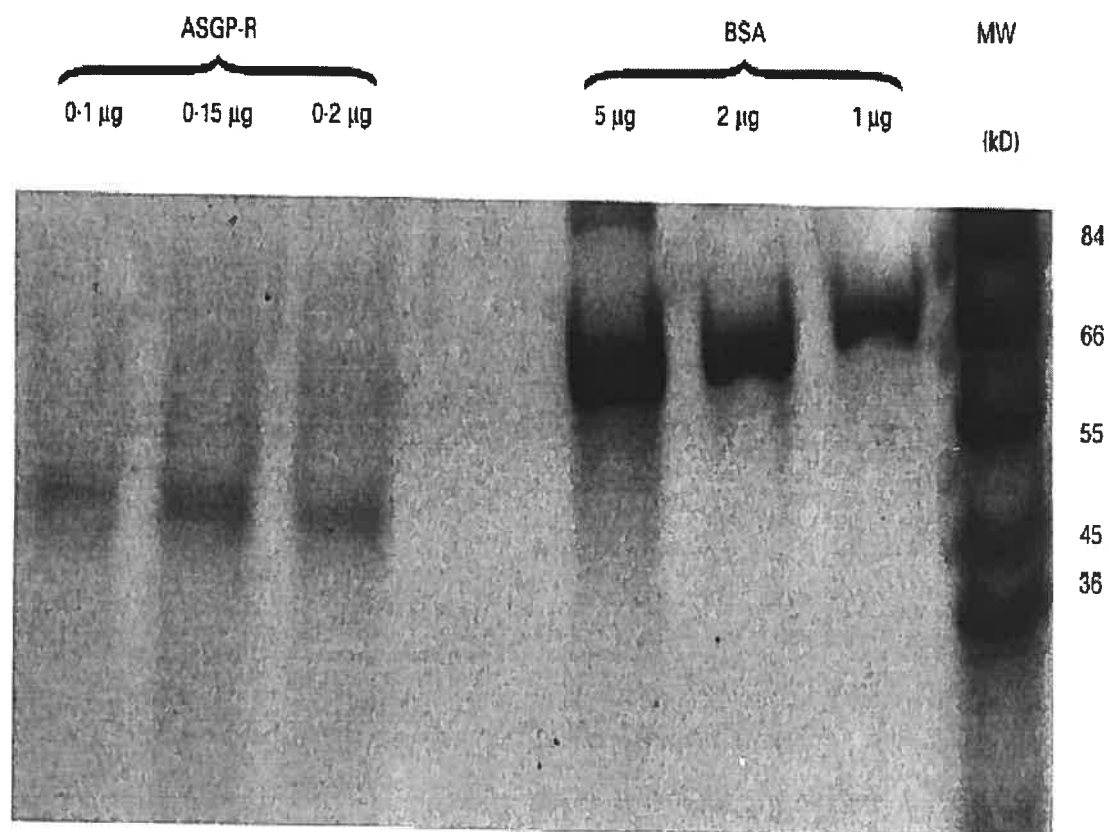


Figure 2. SDS-PAGE analysis of purified human ASGP-R. The first three lanes were loaded with 0.1, 0.15 and 0.2 µg of purified protein. The electrophoretic mobility of the protein was between 46 and 48 kD. Bovine serum albumin (BSA) (1, 2 and 5 µg) and other molecular weight markers (MW) were run as controls.

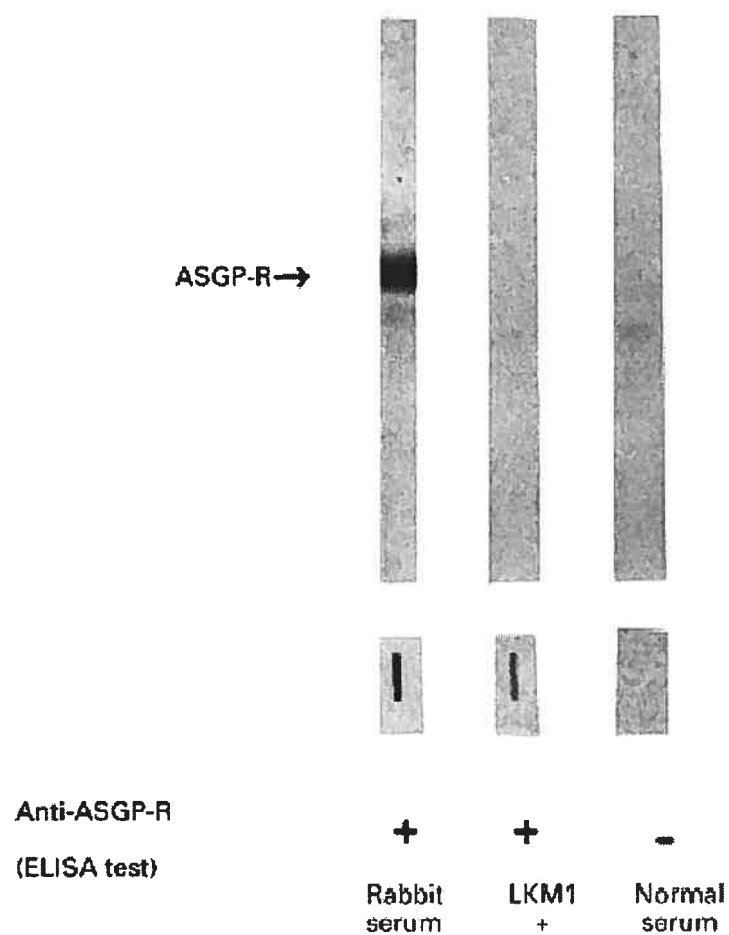


Figure 3. A representative result for western blot and slot blot testing of purified human ASGP-R against sera from patients with AIH. Rabbit serum recognizes the receptor in its native (slot blot) and its denatured (Western blot) forms; the AIH patients' sera were only positive in the slot blot test (this serum was previously tested positive by ELISA using the same antigen).

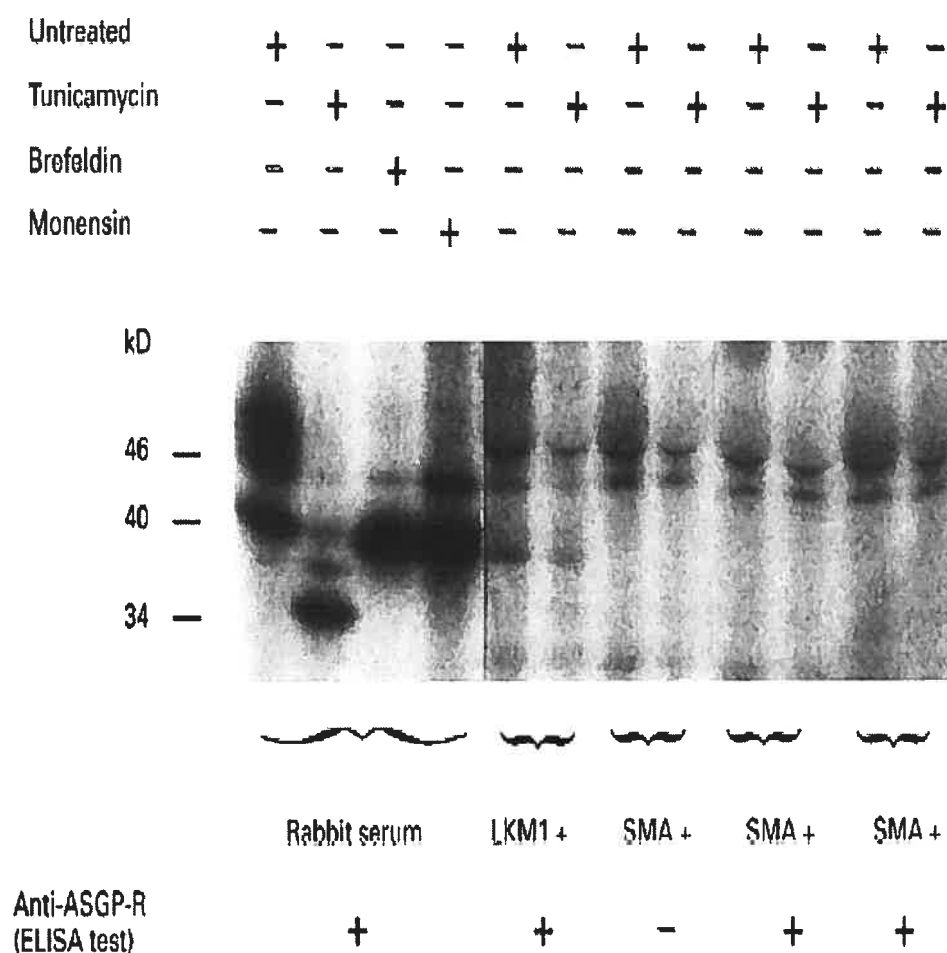


Figure 4. Immunoprecipitation of S^{35} cysteine labelled ASGP-R synthesized by HepG2 cells. Rabbit antibodies immunoprecipitated the protein from untreated cells, as well as from cells treated by tunicamycin, brefeldin or monensin. None of the sera from patients with AIH immunoprecipitated either the mature or the unglycosylated receptor. Bands observed in lines obtained by immunoprecipitation with AIH patients' sera were considered non-specific.

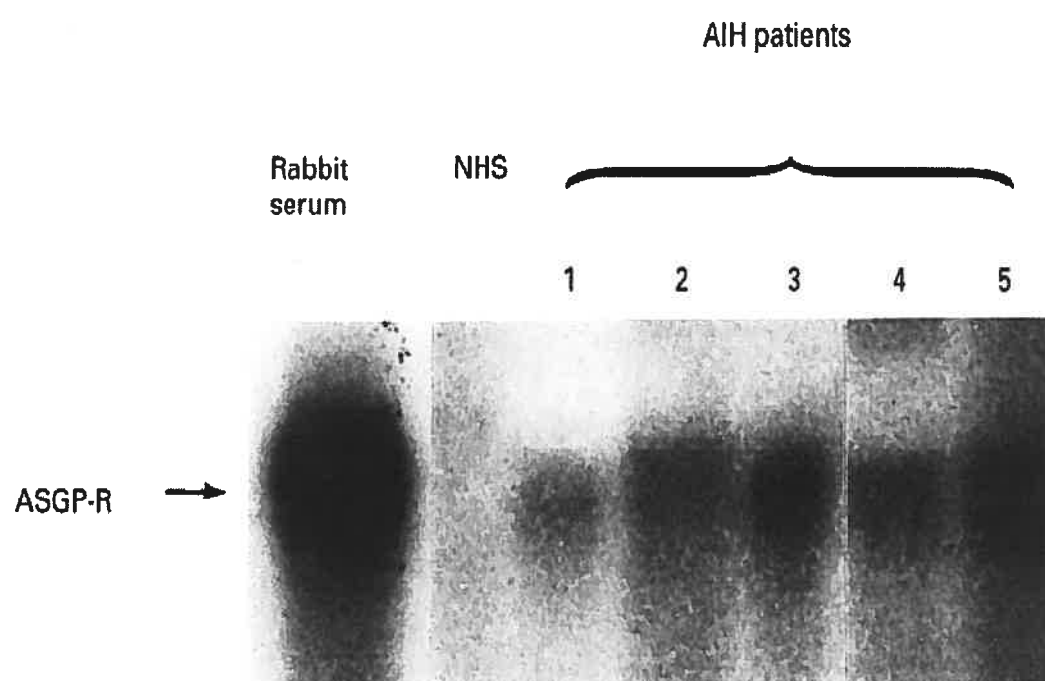


Figure 5. Immunoprecipitation of ^{125}I labelled human ASGP-R. NS: Normal human serum; patients 1-5 were tested positive by ELISA (Patient 5 sera from an adult patient with AIH was kindly provided by Dr. M. Manns).

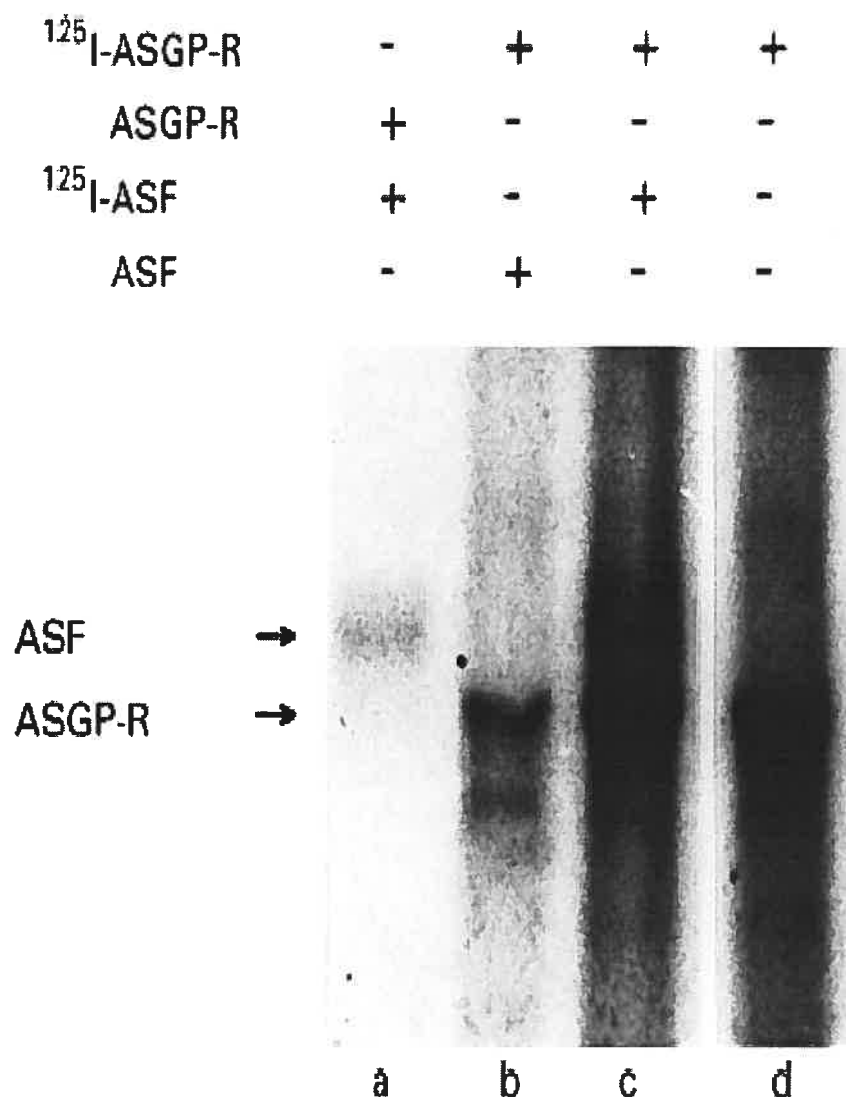


Figure 6. Autoantibodies against human liver ASGP-R are able to immunoprecipitate the protein, even when the binding site of the receptor is occupied by a specific ligand. ^{125}I -labelled (lanes b and c) or unlabelled ASGP-R (lane a) were incubated with ^{125}I -labelled (lanes a and c) or unlabelled ASF (lane b). The complex was immunoprecipitated by anti-ASGP-R positive sera from patients with autoimmune hepatitis. ^{125}I -labelled ASGP-R, without pre-incubation with ASF, and immunoprecipitated by serum of a patient with autoimmune hepatitis, served as a control (lane d).

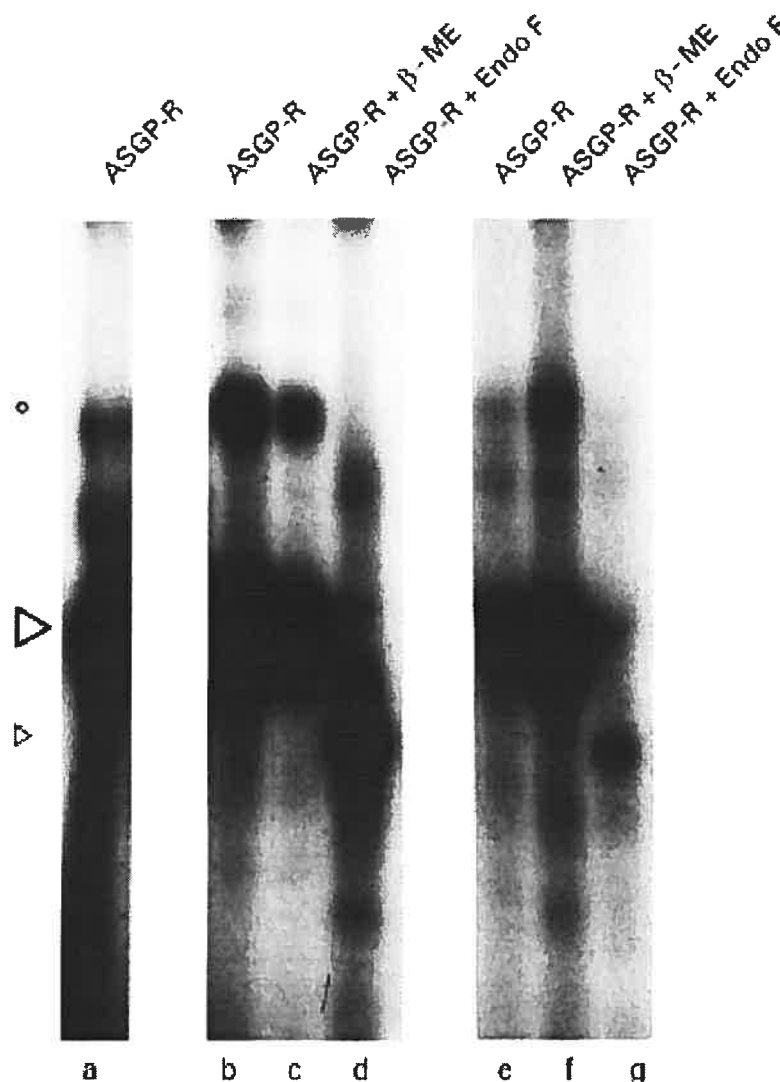


Figure 7. Untreated or treated ^{125}I ASGP-R was immunoprecipitated by rabbit (lanes b,c,d) or human (lanes e,f,g) antibodies. Lane a: 1.2×10^6 cpm of ASGP-R. Rabbit anti-ASGP-R immunoprecipitated: Lane b: 1.2×10^5 cpm of untreated protein; lane c: 0.5×10^5 cpm after β -ME treatment; lane d: 0.5×10^5 cpm after endoglycosidase f treatment. AIH patient serum immunoprecipitated; lane e: 2.1×10^4 cpm of untreated ASGP-R; lane f: 2.9×10^4 cpm of β -ME treated protein; lane g: 1.2×10^4 cpm endoglycosidase F treated protein. Untreated ASGP-R and β -mercaptoethanol (β -ME) treated ASGP-R denoted by open arrowhead; endoglycosidase F (Endo F) treated by filled arrowhead. A high molecular weight band (open circle) was considered to be the partially deaggregated ASGP-R complex.

References

1. Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: A model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* 1990;29:10009-22.
2. McFarlane BM, McSorley CG, Vergani D, McFarlane IG, Williams R. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor [hepatic lectin] in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol* 1986;3:196-205.
3. Treichel U, Poralla T, Hess G, Manns M, Meyer zum Büschenfelde KH. Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. *Hepatology* 1990;11:606-12.
4. Meyer zum Büschenfelde K.H., Treichel U, Löhr H, Fleischer B, Poralla T. Human asialoglycoprotein receptor as an autoantigen in chronic hepatitis. *Immunol Res* 1991;10:497-502.
5. Czaja AJ, Pfeifer KR, Decker RH, Vallari AS. Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996;41:1733-40.
6. McFarlane BM, Sipos J, Gove CD, McFarlane JG, Williams R. Antibodies against the hepatic asialoglycoprotein receptor perfused in situ preferentially attach to periportal liver cells in the rat. *Hepatology* 1990;11:408-15.
7. Hudgin R., Pricer WE, Ashwell G, Stockert R, Morell AG. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* 1974;249:5536-43.

8. Treichel U, Schreiter T, Meyer zum Büschenfelde KH, Stockert RJ. High-yield purification and characterization of human asialoglycoprotein receptor. *Prot Exp Purif* 1995;6:251-5.
9. Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1959;193:265-79.
10. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962;194:495-6.
11. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993;18:998-1005.
12. Paradis K, Dib A, Homberg JC, Bernard O, Alagille D, Alvarez F. Detection of anti-endoplasmic reticulum antibody-positive autoimmune hepatitis in children, using an ELISA technique. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:816-22.
13. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
14. Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, Kreibich G. Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *G. Exp. Med.* 1985;161:1234-6.
15. Ciccarelli E, Alonso MA, Cresteil D, Bollen A, Jacobs P, Alvarez F. Intracellular retention and degradation of human mutant variant of $\alpha 1$ -antitrypsin in stably transfected Chinese hamster ovary cell lines. *Eur J Biochem* 1993;213:271-6.
16. Paietta E, Stockert RJ, Racevskis J. Differences in the abundance of variably spliced transcripts for the second asialoglycoprotein receptor

polypeptide, H2, in normal and transformed human liver. *Hepatology* 1992;12:395-402.

17. Stockert RJ. The asialoglycoprotein receptor: Relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev* 1995;75:591-609.

Acknowledgements: This work was supported by a MRC grant to F.A. O.H. is the recipient of a fellowship from the Canadian Liver Foundation.

Chapitre IV

Hépatite induite par la minocycline

La minocycline connue sous le nom commercial *Minocin*, est un antibiotique semi-synthétique de la famille des tétracyclines qui exerce une action anti-bactérienne dirigée contre certains micro-organismes gram-négatifs et gram-positifs (Dollery et coll, 1991). Elle est utilisée dans le domaine médical afin de traiter principalement des infections d'origine pulmonaire, urinaire et cutanée. Son usage le plus connu concerne le domaine du traitement contre l'acné (Healy et coll, 1994). Un premier cas d'hépatotoxicité aiguë induite par la minocycline a été rapporté chez une patiente lors de son administration par voie intraveineuse à forte dose (Burette et coll, 1984). Par la suite, des cas d'hépatite fulminante (Bourdreaux et coll, 1993), chronique (Malcom et coll, 1996) et auto-immune (Gough et coll, 1996) ont été liées à ce médicament. Plus de 30 cas d'hépatites induites par la minocycline ont été rapportés lors des dix dernières années. L'analyse de ces patients a montré la sévérité des réactions causées par ce médicament: deux patients sont décédés et l'état d'un patient a nécessité une transplantation (Gough et coll, 1996). D'autre part, des manifestations de type allergiques telles que la fièvre, l'éruption cutanée, l'adénopathie et l'hyperéosinophilie, ont été induites par la minocycline (Davies et coll, 1989). Biologiquement, ces patients présentaient une hypergammaglobulinémie. Cette hépatite affecte surtout les adolescentes et les jeunes femmes. L'âge moyen de ces patients est de 21 ans (Elkayam et coll, 1999). Le diagnostic de l'hépatite induite par la minocycline a été retenu sur l'absence de marqueur sérique d'une infection à virus B et C et sur la présence d'auto-anticorps. Différents auto-anticorps ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'hépatite induite par la minocycline tels que les ANA, pANCA, les SMA et les LKM (Teitelbaum et

coll, 1998). Les symptômes cliniques disparaissaient en général rapidement après l'arrêt du traitement à la minocycline, et cette amélioration est accompagnée d'une diminution de titre d'auto-anticorps sériques. Le mécanisme de l'hépatotoxicité induite par la minocycline n'est cependant pas encore connu. Un mécanisme semblable à celui de l'hépatite immuno-allergique induite par l'acide tiénilique, par la dihydralazine ou par l'halothane pourrait être envisagé. Des études effectuées chez la souris ont montré que les effets hépatotoxiques directs de la minocycline pourraient être liés à la formation d'un métabolite réactif (Bocker et coll, 1991). La minocycline est complètement absorbée à la suite de son administration orale. La quantité de minocycline qui atteint les tissus est élevée, puisque sa concentration dans les tissus est habituellement plus élevée que dans le sérum. Cette grande distribution est due à la grande liposolubilité de la minocycline (Kapusnik-Uner et coll, 1996).

Résumé de l'article : Study of immune reactivity of minocycline induced chronic active hepatitis. Herzog D, Hajoui O, Russo P, Alvarez F. Digestive Diseases and Sciences. 1997, 42(5) : 1100-1103.

Dans cet article, nous rapportons le cas d'une adolescente atteinte d'hépatite chronique active induite par la minocycline suite à un traitement contre l'acné. Chez cette patiente, on a noté la présence d'un titre élevé d'anticorps anti-noyaux (ANA) et des transaminases sériques bien que le titre des gammaglobulines soit normal. La patiente est atteinte d'une thyroïdite d'Hashimoto (maladie auto-immune associée) et la biopsie hépatique a révélé une hépatite agressive avec une inflammation portale. Le but de cette étude est de montrer la présence dans le sérum de la patiente d'auto-anticorps dirigés contre des protéines hépatiques et, en particulier, contre les cytochromes P450 qui sont responsable du métabolisme de la plupart des médicaments. L'immunoprécipitation de protéines marquées à la cystéine S³⁵, isolées à partir de cellules HepG2, a été réalisée en utilisant le sérum de la patiente. Nous avons utilisé des sérums de patients atteints d'HAJ de type 2 (présentant des anticorps anti-LC1, LKM1 et LKM1/LC1) comme contrôles. Dans le sérum de la patiente atteinte d'hépatite à la minocycline, la recherche d'anticorps dirigés contre différents cytochromes P450 purifiés (CYP3A6, CYP1A2, CYP2B4 et CYP2C4) et contre la fraction totale des microsomes de foie de rata été effectuée par la technique d'ELISA.

Le sérum de la patiente traitée à la minocycline présente des anticorps dirigés contre deux protéines de 50 et 90 kD exprimées dans les cellules. Les cytochromes CYP3A6 et CY2C4 ainsi que la fraction microsomale de foie de rat sont reconnus en ELISA par les anticorps présents dans le sérum de la patiente. Le même sérum testé en Western-blot présente des anticorps dirigés contre une protéine microsomale de foie de 50 kD. Le sérum de la patiente contient des anticorps dirigés contre différentes protéines des hépatocytes, en particulier, les cytochromes P450 tels que les

CYP3A6 et CYP2C4. D'autres études seront nécessaires pour identifier les deux protéines de 50 et 90kD reconnues par le sérum de la patiente. Ces résultats appuient l'hypothèse que l'hépatite observée chez la patiente étudiée est la conséquence d'une réaction immune induite après un traitement à la minocycline. Le métabolite réactif responsable de cette hépatotoxicité n'est pas encore identifié. Le mécanisme de l'hépatotoxicité induite par la minocycline reste encore à clarifier, mais il est possible d'envisager un mécanisme semblable à celui observé dans le cas des hépatites induites par l'acide tiénilique, la dihydralazine ou l'halothane.

**STUDY OF IMMUNE REACTIVITY OF A MINOCYCLINE INDUCED
CHRONIC ACTIVE HEPATITIS**

Denise Herzog, Oumnia Hajoui, P. Russo, Fernando Alvarez. *Digestives
Diseases and Sciences*, 42(5):1100-1103, 1997 May
Division of Gastroenterology and Nutrition, Department of Pediatrics,
Sainte-Justine Hospital, University of Montreal, Montreal, Canada.

Short title: Minocycline induced chronic active hepatitis

Grant: This work is supported by an MRC grant to F.A. D.H. is recipient of a
fellowship from les fonds du Plan de Pratique of the Department of
Pediatrics, University of Montreal.

Correspondence: F. Alvarez, MD, Associate Professor, Division of
Gastroenterology and Nutrition, Department of Pediatrics, University of
Montreal, Sainte-Justine Hospital, 3175 Côte Sainte Catherine, Montreal QC
H3T 1C5, Canada.

Tel: 514-345-4626, Fax: 514-345-4999.

ABSTRACT

Hepatotoxicity of minocycline, a semisynthetic tetracycline, leading to microsteatosis, allergic reactions or a syndrome similar to autoimmune hepatitis has been described. We describe the case of a female adolescent with Hashimoto's thyroiditis, 18 months of minocycline intake for acne, who presented with an anti-nuclear antibody (ANA) -positive chronic active hepatitis. After cessation of minocycline therapy, the chronic active hepatitis subsided. Testing the patient's serum by immunoprecipitation against human hepatoma cells, antibodies against a 50- and a 90 -kDa protein could be visualized. Furthermore the patient's serum recognizes a 50kDa protein of rat liver microsomes when tested by western blot, and different purified P450 proteins by ELISA test. We speculate that there must be an antibody reaction against an as yet unknown metabolite of minocycline which cross-reacts with several microsomal cytochromes. Furthermore, this finding suggests that the hepatotoxicity of minocycline could be mediated by an immune response.

Key words: Minocycline, chronic active hepatitis, autoantibodies

Abbreviations: AIH= autoimmune hepatitis

ANA= antinuclear antibody

LC1= liver cytosol antibody type 1

LKM1= liver-kidney microsome antibody type 1

LM= liver membrane antibody

INTRODUCTION

Minocycline is a semisynthetic tetracycline with a high lipophilicity that results in nearly complete intestinal absorption and with a half life of 16-18h. Its pathway of metabolism is not completely known yet (1). Toxicity associated with minocycline was first seen in pregnant women who were treated intravenously for pyelonephritis with more than 2g per day. The syndrome presented as microvesicular steatosis, eventually associated with pancreatitis and azotemia (2, 3). Later, more than one type of hepatotoxic reaction has been recognized especially in orally treated patients with acne. A hypersensitivity reaction with fever, rash, arthralgias, hypereosinophilia and an acute hepatitis which subsides after cessation of minocycline may be attributed to this agent. Fatal cases and the need for transplantation have been described (4, 5). A third type of hepatotoxic reaction to minocycline, also in patients treated long-term for acne with this agent, presents an autoantibody-positive chronic active hepatitis without eosinophilia, other allergic features or microvesicular steatosis, and affects mostly women. It equally subsides after withdrawal of the drug. Eight cases with chronic active hepatitis secondary to minocycline, positive for anti-nuclear antibodies (ANA), yet without hypergammaglobulinemia, have been described (6, 7). The mechanism by which an autoimmune reaction develops is not known. An analogous mechanism to Liver-kidney microsome antibody type 2 (LKM2) -positive toxic hepatitis secondary to tielinic acid could be postulated. We describe a case of chronic active hepatitis secondary to minocycline treatment for acne in a female adolescent and give evidence of additional antibodies to hepatocyte proteins visualized by immunoprecipitation.

CASE REPORT

A sixteen year old female adolescent was seen in our department for elevated serum transaminases. Her medical and surgical history was unremarkable, with no history of drug abuse or regular intake of medicaments, except for minocycline 50 mg per day for 18 months for her acne. Diagnosis of a Hashimoto thyroiditis with positive anti-thyroidal microsomal antibodies (1/40), TSH 9.6m U/liter (normal < 4), T3 0.9 nmol/liter (normal 0.9-2.8), T4 48 nmol/liter (normal 60-148) was made 4 months earlier and the patient had begun to complain about migratory arthralgias three months before referral. Two months later elevated alanine aminotransferase (ALT) (392 units/liter, normal 5-34) and aspartate aminotransferase (AST) (357 units/liter, normal 11-43) were found and the patient was referred to the hepatology unit of Sainte Justine Hospital. Her weight was between the 50th and 75th percentiles, height between 25th and 50th percentiles. There was no hepatosplenomegaly and no signs for chronic hepatopathy and the remaining examination were normal. Serologies for hepatitis A, B and C and CMV were negative. EBV IgG was positive, but there were no signs for an ongoing infection with this virus. C3 and C4 were normal. Antistreptolysin and anti-DNAse titer were not elevated. HLA B 27 was negative. Anti-nuclear antibodies were revealed to be of the homogenous type by indirect immunofluorescence with a titer of 1/1280. Anti-smooth muscle antibodies, anti-liver kidney microsomal type 1 antibodies, anti-liver cytosol type 1 antibodies, anti-mitochondrial antibodies, anti-thyroglobuline and anti-parietal cell antibodies were negative by indirect immunofluorescence. There was no eosinophilia. Serum gammaglobuline concentration was 13.2 g/liter (normal 7-13), total protein 73 g/liter (normal 60-80). Because autoimmune hepatitis was suspected, a liver biopsy was performed. Chronic portal inflammation with lymphocytes, plasmacytes, eosinophils and a minimal degree of piecemeal necrosis with some intralobular inflammation including councilman bodies were the main

histological features of the biopsy. At the time of the biopsy, serum transaminases had decreased (ALT 136 units/liter, AST 156 units/liter), and there was no coagulopathy nor cholestasis. After cessation of minocycline, her arthralgias disappeared and serum transaminases normalized totally and remained normal during a two year follow-up. The acne worsened without antibiotic treatment.

MATERIALS AND METHODS

Sera: Serum from the patient reported above was tested by the different methods described below. As controls, sera from patients with LKM1 and /or Liver cytosol antibody type 1 (LC1) -positive autoimmune hepatitis (AIH) type 2 and from healthy controls were used.

HepG2 Cell Culture and Labelling: HepG2 cells were obtained from ATCC, and maintained in minimum essential medium (MEM) containing Earle's salts, nonessential amino acids, glutamine, 10% fetal calf serum and streptomycin/penicillin. Cultures were made in six-well plates and maintained at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. For labelling, cells (approximately 1×10^6) were rinsed with PBS and incubated for 30 minutes at 37°C with MEM without cysteine. Later, this media was replaced by fresh MEM with 200 µCi/ml of [³⁵S]cysteine and cells were maintained at 37°C for another 30 min. Pulse chase was performed by replacing the radioactive media with MEM containing unlabelled cysteine at 500 times higher concentrations than the radioactive amino acid. Incubation was continued for 90 min at 37°C. At the end of this period, cells were resuspended in 500 µl of the following buffer: 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40. The antigen was then immunoprecipitated from the suspension (see below).

Immunoprecipitation: Immunoprecipitation of hepatocyte antigens was made from 200 μ l of a HepG2 cell suspension, diluted with 4 volumes of 190 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 6 mM EDTA and 2.5% Triton X-100. Two microliters of serum were added to each immunoprecipitation test tube, and the samples were incubated at 4°C overnight. Control sera used in the immunoprecipitation reaction were positive for LKM1 and LC1 antibodies by indirect immunofluorescence; negative controls were healthy subjects.

ELISA: CYP3A6, CYP2B4, CYP1A2, CYP2C4 purified from rabbit liver were a gift from Dr. Maurel, Montpellier, France. Human liver was obtained from the right lobe of a brain-dead donor from whom only the left lobe was transplanted. The microsomal subcellular fraction was prepared by differential centrifugation as previously described (8) and microsomal protein concentration was measured as described by Lowry et al. (9). Fifty nanograms of CYP3A6, CYP2B4, CYP2C4, CYP1A2 and 1 μ g of human liver microsomes were loaded on a 96-well polystyrene plate and then dessicated at 65°C overnight, saturated with PBS gelatin 0.2% and incubated with the patient's serum, as well as with LKM1, LKM2, liver microsome antibody (LM) -positive and -negative control sera, in a dilution 1/100 to 1/800 in PBS gelatin 0.2%, Triton X-100 0.02%. Washing was done four times at room temperature with PBS gelatin 0.2% Triton X-100 0.02%. As second antibody a goat anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase (Tago Inc., Burlingame, California) diluted 1/1000 with PBS gelatin 0.2% Triton X-100 0.02% was used. After four more washings, 100 micrograms p-nitrophenylphosphate (Sigma, St. Louis, MO) in sodium carbonate 0.05 M and magnesium chloride 0.001 M were added to each well. After 30 min at room temperature in the dark, optical density was measured using a Behring ELISA Processor II at 405 nm. Values exceeding twice the mean value of normal controls were considered positives.

RESULTS AND DISCUSSION

In this report we describe hepatotoxicity secondary to orally administered minocycline in an female adolescent with acne. Elevated serum transaminase activity, high levels of anti-nuclear antibodies but normal gammaglobulinemia were found together with a histological picture of aggressive hepatitis. Lack of hypereosinophilia, rash, fever and lymphadenopathy excuded an allergic, idiosyncratic reaction (4). The challenging differential diagnosis in this patient was that of an autoimmune hepatitis type 1 (AIH). According to the recently published scoring system for diagnosis of AIH (14) the patient reached 13 points in the pretreatment score, suggesting a probable diagnosis of AIH. Gender, the presence of elevated ANA and of Hashimoto's thyroiditis on one hand, and lack of blood transfusion, hepatotropic viral infection and alcohol intake on the other hand result in the high score. It was the lack of hypergammaglobulinemia that prompted the clinician to stop minocycline treatment before starting immunosuppressive therapy. Previous reports of such autoimmune reaction during a minocycline treatment lead to the hypothesis, that the mechanism of toxicity could be analogous to that described in toxic hepatitis secondary to ingestion of tielinic acid or dihydralazine. Covalent binding of a reactive drug metabolite with the metabolizing protein CYP2C9 or 1A2 results in an antigenic molecule in these types of toxic hepatitis (15). The exact metabolic pathway of minocycline is not known, but it is metabolized by the liver and excreted into bile. Similarly, the mechanism that leads to an autoimmune reaction is unknown. We were in fact able to show that the patient's serum precipitated proteins of 90 kDa and 50 kDa from a human hepatoma cell line (HepG2), when tested by immunoprecipitation. LC1- and LC1/LKM1 - positive sera precipitated a protein of 60 kDa (figure 1). Negative control sera and LKM1 -positive sera did not precipitate any protein, because CYP2D6 is not constitutively expressed in HepG2 cell line. Finally, when tested by ELISA, the patient's serum recognized CYP3A6, CYP2C4 and non-induced rat liver microsomes in a dilution of 1/800. We conclude, that

the patient's serum contains antibodies that recognize different microsomal cytochromes either in linear or in conformational state. This finding supports the hypothesis that the patient's hepatitis was a consequence of an autoimmune reaction induced by the minocycline treatment. Cross-reactivity with different P 450s is probably due to sequence and conformational homologies between those molecules. Further studies are necessary, to identify the 50- and the 90 -kDa protein and their relation to the metabolism of minocycline.

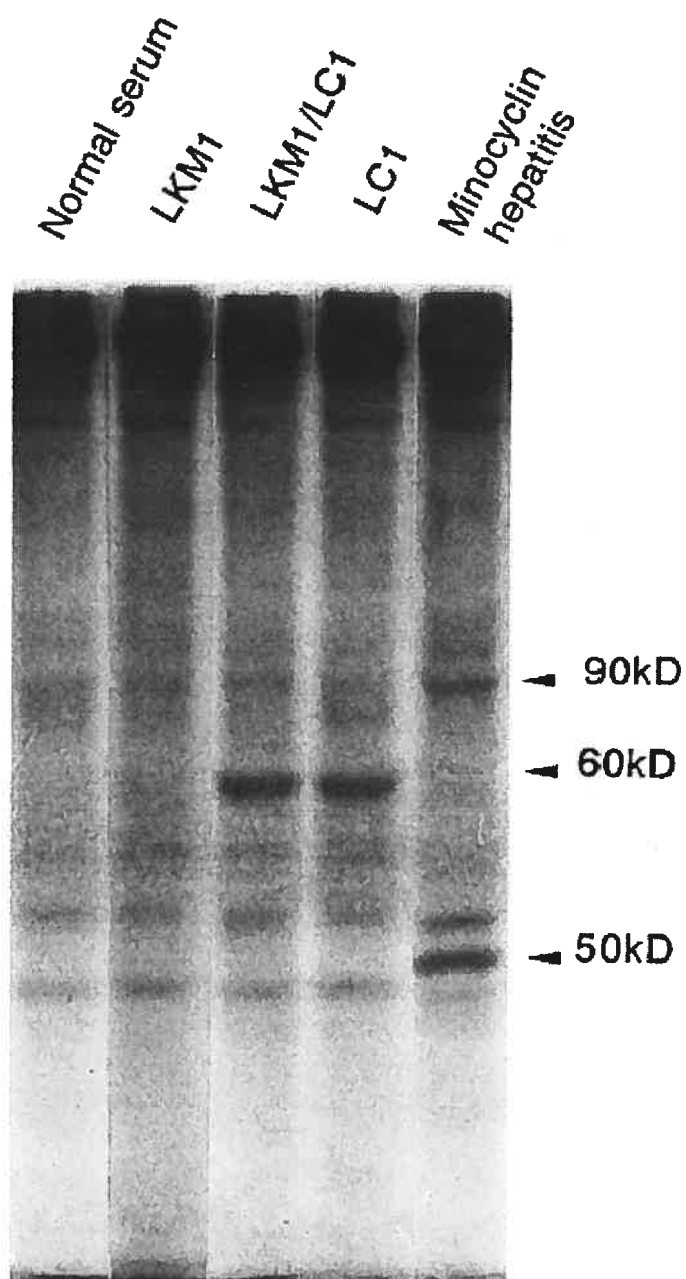


Figure 1: Immunoprecipitation of radiolabelled HepG2 cells with the patients serum and four control sera, separation by SDS-PAGE and fluorography. The normal and the LKM1 positive sera do not precipitate any protein, the LKM1/LC1 and the LC1 positive sera precipitate a 60 kD protein and the patients serum precipitates two proteins, one of 90 and one of 50 kD.

REFERENCES

1. Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Antimicrobial agents: tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limberd LE, (eds). 9th ed. New York, Mc Graw-Hill, 1996, pp 1124-1130
2. Burette A, Finet C, Prigogine T, DeRoy G, Deltenre M: Acute hepatic injury associated with minocycline. *Arch Int Med* 144:1491-1492, 1984
3. Combes B, Whalley PJ, Adams RH: Tetracycline and the liver: Clinical manifestations of tetracycline toxicity. *Prog Liver Dis* 4: 589-596, 1972
4. Min ID, Burke PA, Lewis WD, Jenkins RL: Acute hepatic failure associated with oral minocycline: a case report. *Pharmacotherapy* 12:68-725, 1992
5. Davies MG, Kersey PJW: Acute hepatitis and exfoliative dermatitis associated with minocycline. *BMJ* 298: 1523-1524, 1989
6. Gough A, Chapman S, Wagstaff K, Emery P, Elias E: Minocycline induced autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus-like syndrome. *BMJ* 31: 169-172, 1996
7. Malcolm A, Heap TR, Eckstein RP, Lunzer MR: Minocycline-induced liver injury. *Hepatology* 22: 452A, 1995
8. Amar-Costesec AH, Beaufay M, Wibo D, Thines-Sempoux E, Feytmans E, Robbi M, Berthet J: Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. Preparation and composition of the microsomal fraction. *J. cell biol* 61: 201-212, 1974
9. Lowry D, Rosebrough N, Farr A, Randall R: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275, 1959
10. Rich KM, Sesardic D, Foster JR, Davies DS, Boobis R: Immunohistochemical localization of cytochrome p450b/e in hepatic and extrahepatic tissues of the rat. *Biochemical Pharmacology* 38: 3305-3322, 1989

11. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
12. Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, Kreibich G: Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 161: 1231-1236, 1985
13. Perez N, Herzog D, Jacqz-Aigrin E, Homberg JC, Alvarez F: Study of the B-cell response to CYP2D6 in sera from chronic hepatitis C patients. *J Clin Exp Med* (in press).
14. Czaja AJ, Carpenter HA: Validation of scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 41: 305-314, 1996
15. Bourdi M, Larrey D, Nataf J, Berbuau J, Pesayre D, Iwasaki M, Guengerich P, Beaune PH: Anti-liver endoplasmatic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P4501A2. *J Clin Invest* 85: 1967-1973, 1990

Chapitre V

Discussion Générale

Des auto-anticorps dirigés contre différents cytochromes P450 sont présents dans le sérum de patients atteints d'HA1 de type 2 et d'hépatite immuno-allergique induite par les médicaments. Dans le cas de l'HA1 de type 2, les anticorps anti-LKM1 sont dirigés spécifiquement contre la protéine CYP2D6. Un épitope antigénique dominant reconnu par le sérum de patients anti-LKM1 positifs (qui constituent 85% des patients) a été identifié dans la région 257-269. Plusieurs autres sites antigéniques linéaires ont été identifiés sur la protéine CYP2D6, correspondant aux séquences d'acides aminés 321-351, 373-389 et 410-429 (Yamamoto et coll, 1993). Cependant, l'identification de ces sites antigéniques au niveau de la protéine CYP2D6 a été initialement effectuée selon la technique de Western-blot en conditions dénaturantes ou en utilisant des peptides synthétiques (Gueguen et coll, 1991; Manns et coll, 1989 et Yamamoto et coll, 1993). Il nous est apparu nécessaire de localiser ces sites antigéniques au niveau de la protéine à l'état natif.

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que les anticorps dirigés contre les 4 sites antigéniques 254-271, 321-352, 373-389 et 410-429 sont préabsorbés par les microsomes hépatiques. Ainsi, ces sites antigéniques linéaires sont situés à la surface de la protéine dans son état natif. La deuxième partie de notre étude a été centrée sur l'existence d'anticorps dirigés contre les sites conformationnels de la protéine. Pour cela, nous avons analysé *in vitro* les propriétés d'inhibition métabolique de l'isoenzyme CYP2D6 par les anticorps anti-LKM1. En effet, le cytochrome CYP2D6 catalyse la O-déméthylation du dextrométhorphan (DEM) en dextrorphan (DOR) et la quantité de DOR a souvent été utilisée pour mesurer l'activité *in vitro* du CYP2D6 (Dayer et coll, 1989). Les auto-anticorps anti-LKM1 sont reconnus pour leur capacité d'inhiber le

métabolisme de différents médicaments catalysés par CYP2D6 (Danger et coll, 1988; Jacqz-Aigrain et coll, 1991). Ces études n'avaient pas pu établir si ces auto-anticorps anti-LKM1 se liaient à des sites linéaires ou conformationnels de la protéine CYP2D6. Nous avons montré que les anticorps dirigés contre des séquences linéaires (que ce soit des anticorps purifiés par affinité contre des peptides synthétiques ou des anticorps de lapin dirigés contre des séquences linéaires) n'inhibent pas l'activité enzymatique liée au métabolisme du DEM. De plus, l'incubation préalable du sérum de patients atteints d'HAI avec des peptides synthétiques provoque une inhibition métabolique équivalente à celle induite par les sérums purs. Ces résultats indiquent que les anticorps anti-LKM1 dirigés contre les sites antigéniques linéaires de la protéine CYP2D6, testée dans sa forme native ou dénaturée, ne sont pas responsables de l'inhibition du métabolisme du DEM. Waxman et collaborateurs ont montré par la technique de dot-blot que les anticorps LKM1 réagissent avec plusieurs isoenzymes de cytochromes P450 de la famille 1A. Cette technique présente l'intérêt de préserver l'intégrité conformationnelle des protéines. Or, la réactivité entre les anticorps anti-LKM1 et les cytochromes de la famille CYP1A disparaît si ces derniers subissent un traitement dénaturant. Les auto-anticorps LKM1 réagissent donc probablement avec des sites conformationnels de la sous-famille CYP1A (Waxman et coll, 1988). Ces résultats penchent en faveur de l'existence de sites conformationnels de la protéine CYP2D6 reconnus par les anticorps anti-LKM1. Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'activité enzymatique du CYP2D6 par ces auto-anticorps anti-LKM1 restent inconnus. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées : Les anticorps anti-LKM1 peuvent modifier l'activité métabolique de l'enzyme CYP2D6 en interférant avec sa structure tertiaire, en se fixant sur le site actif de la protéine ou sur le site de liaison du substrat. Les auto-anticorps dirigés contre les régions linéaires ne sont en effet pas dirigés contre le site actif du cytochrome CYP2D6 (cystéine en position 440) ou contre des régions hydrophobes capables de lier le substrat

(Jacqz-Aigrain et coll, 1990; Yamamoto et coll, 1993). D'autres études sont nécessaires pour expliquer le ou les mécanismes impliqués dans cette inhibition. Lors d'une immunisation conventionnelle ou après une infection, les anticorps sont dirigés surtout contre des sites conformationnels (Laver et coll, 1990). La réponse immune peut être similaire dans le cas des maladies auto-immunes. Ainsi, des épitopes conformationnels ont été mis en évidence sur le complexe pyruvate déshydrogénase reconnu par les auto-anticorps anti-mitochondries dans la maladie de cirrhose biliaire primitive (Rowley et coll, 1991). L'ensemble de ces résultats indique néanmoins que la réponse anti-LKM1 est une réponse polyclonale dirigée contre des sites linéaires et conformationnels de l'auto-antigène CYP2D6. Ce type de réponse a déjà été décrit dans d'autres maladies auto-immunes (Rowley et coll, 1991; Surh et coll, 1990).

En ce qui concerne les mécanismes impliqués dans la production d'auto-anticorps anti-LKM1 dirigés contre le CYP2D6 chez les patients atteints d'HAI de type 2. Deux hypothèses ont été proposées : 1) les patients atteints d'HAI de type 2 pourraient exprimer une protéine CYP2D6 différente de celle exprimée chez les individus normaux et qui serait ainsi immuno-antigénique. 2) la protéine CYP2D6 possède une homologie de séquence avec des protéines virales qui peuvent, par le biais du phénomène de mimétisme moléculaire, déclencher une réponse auto-immune.

Il est bien admis que le cytochrome CYP2D6 est absent ou non fonctionnel chez 5-10% de la population caucasienne (Gonzalez et coll, 1988). Pour vérifier la première hypothèse, l'ARN messager ainsi que la présence et l'activité du CYP2D6 dans le foie ont été analysés chez les patients présentant des anticorps anti-LKM1. Aucune anomalie du gène codant pour l'antigène CYP2D6 n'a pu être détectée chez ces patients (Yamamoto et coll, 1992). La taille de l'ARNm codant pour CYP2D6 et de la protéine elle-même est identique à celles d'individus normaux. Le métabolisme du DEM catalysé par CYP2D6 a été étudié *in vivo* chez les patients anti-LKM1 positifs à travers la quantification du DOR excrétée dans les urines. Tous les

patients atteints d'HAI de type 2 testés sont des métaboliseurs rapides (Jacqz-Aigrain et coll, 1990). Dans notre étude, les caractéristiques de la cinétique enzymatique du métabolisme du DEM démontrent la nature fonctionnelle du CYP2D6 de la fraction microsomale choisie, et donc le caractère phénotypique "métaboliseur rapide" du donneur. La mise en évidence de cette propriété était essentielle à la poursuite de l'étude. Les mêmes résultats ont été obtenus *in vitro* en utilisant les fractions microsomales de biopsies de patients anti-LKM1 positifs (Manns et coll, 1991). Ceci montre qu'il n'existe pas de différences de structure et de fonction du CYP2D6 chez les patients anti-LKM1 comparés aux individus normaux. La présence du CYP2D6 dans les hépatocytes semble donc être nécessaire à l'induction et/ou au maintien de la réponse auto-immune. Or pour que l'auto-antigène CYP2D6 soit reconnu par les auto-anticorps circulants et que les anticorps anti-LKM1 jouent un rôle dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune de type 2, il faut que la protéine soit exposée à la surface de la cellule. Certaines études ont montré que divers cytochromes P-450 sont présents à la surface cellulaire des hépatocytes de rat (Loeper et coll, 1990, Muratori et coll, 2000) et des hépatocytes humains (Loeper et coll, 1993). Par contre, d'autres études de localisation du cytochrome CYP2D6 ont montré que cette protéine est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique et est absente au niveau de la membrane plasmique (Yamamoto et al, 1993). Ainsi, la localisation du cytochrome CYP2D6 au niveau de la membrane hépatocytaire est controversée. D'autres travaux seront donc nécessaires pour confirmer la responsabilité d'auto-anticorps anti-LKM1 dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune.

Le deuxième mécanisme invoqué pour expliquer la production d'auto-anticorps est le mimétisme moléculaire. Ce phénomène met en jeu des anticorps ou des cellules T produits en réponse à un agent infectieux, qui réagissent par une réaction croisée avec des antigènes du soi. Plusieurs travaux sont en faveur d'une association entre l'infection virale et la présence

d'auto-anticorps dans le sérum de patients. Ainsi, des auto-anticorps anti-LKM3 sont présents dans environ 13% de sérums de malades atteints d'hépatite chronique à virus D (HVD) (Crivelli et coll, 1983). Les anticorps anti-LKM1 ont été détectés dans le sérum chez 5% à 10% de patients infectés par le virus de l'hépatite C (Abuaf et coll, 1993). Comme dans le cas des HAI de type 2, ces anticorps anti-LKM1 présents dans le sérum LKM1+/HCV+ sont dirigés contre l'auto-antigène CYP2D6. Un site antigénique principal reconnu par les sérums de patients adultes LKM1+/HCV+ a été identifié dans la région 321-339 du CYP2D6 (Parez et coll, 1996), et ce même épitope est reconnu par 50% de sérums de patients atteints d'HAI de type 2 (LKM1+/HCV-) (Yamamoto et coll, 1993). Une étude effectuée récemment a montré l'existence d'un épitope dominant commun situé dans la région 193-212 du CYP2D6 reconnu par 93% de sérums de patients atteints d'HAI de type 2 (LKM1+/HCV-) et par 50% de sérums de patients LKM1+/HCV+ (Kerkar et coll, 2003). Le tableau 5 représente une comparaison d'épitopes linéaires de la protéine CYP2D6 reconnus par les sérums de patients LKM1+/HCV- (HAI de type 2) et de patients LKM1+/HCV+.

La recherche d'homologie de séquence d'acides aminés entre l'épitope 193-212 du CYP2D6 et les protéines de banques de données ont montré une importante similarité avec deux protéines virales. Une similitude de séquence de 6 acides aminées "RLDLA" a été trouvée entre le peptide 193-212 du CYP2D6 et le virus HCV (région 2977-2996 de la protéine non structurale 5B) et le cytomégalovirus (région 121-140 de l'exon CMV) (Kerkar et coll, 2003). Cette similitude est un argument en faveur de l'induction d'une réponse auto-immune par mimétisme moléculaire suite à l'infection virale (figure A).

Chez les patients atteints d'HAI, les anticorps anti-LKM1 sont associés dans 30% des cas aux anticorps anti-LC1. Ces derniers peuvent être les seuls marqueurs sérologiques chez 10% de patients atteints d'HAI de type 2 (Martini et coll, 1988, Muratori et coll, 1998). Les anticorps anti-LC1 sont

dirigés contre une protéine de 62 kD du cytosol hépatique. En immunofluorescence indirecte, les auto-anticorps anti-LKM1 masquent les anticorps anti-LC1. Pour identifier l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1, il nous est apparu nécessaire de choisir une banque d'expression d'ADNc de cellules n'exprimant pas l'auto-antigène CYP2D6. Puisque les hépatocytes humains expriment aussi bien le cytochrome CYP2D6 que l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1, nous avons alors choisi les cellules HepG2. Ces cellules n'expriment pas l'auto-antigène CYP2D6 mais possèdent plusieurs fonctions comparables aux hépatocytes de foie humain. Les cellules HepG2 représentent donc un bon modèle pour cloner l'auto-antigène reconnu par les anticorps anti-LC1. La démarche expérimentale que nous avons choisie pour identifier l'auto-antigène, est l'immuno-criblage d'une banque d'expression d'ADNc de cellules HepG2. Nous avons utilisé les auto-anticorps anti-LC1 présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2. De nombreux auto-antigènes avaient auparavant été identifiés par cette méthodologie, tel l'auto-antigène CYP2D6 reconnu par les anti-LKM1 (Guengen et coll, 1988, 1989) et, plus récemment, l'auto-antigène *UGA supprimeur tRNA associated protein* reconnu par les auto-anticorps SLA/LP (Costa et coll, 2000). Un clone LCHC1 de 653 pb a été isolé et a révélé une importante homologie (85.2% en acides aminés) avec l'enzyme cytosolique formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD) du foie de cochon. Nous avons utilisé plusieurs stratégies pour confirmer cette hypothèse. Les ARNm ont été isolés à partir de foie humain et des cellules HepG2, puis hybridés avec deux sondes d'ADNc du clone LCHC1 et du CYP2D6. Nous avons alors montré que l'ARNm du FTCD est présent dans le foie humain et dans les cellules HepG2. Par contre, seuls les hépatocytes exprimaient l'ARNm du CYP2D6. Nous avons produit par la suite une protéine recombinante à partir de la région C-terminale du clone LCHC1 et démontré l'existence d'une réactivité croisée entre cette protéine recombinante du clone LCHC1 et la protéine cytosolique 62kD de foie humain. L'auto-antigène reconnu par les auto-

anticorps LC1 est donc bien l'enzyme cytosolique FTCD. Cette protéine est exprimée par les hépatocytes sous une forme libre cytosolique ou associée avec le complexe golgien (Bashour et coll, 1998; Hennig et coll, 1998; Renous et coll, 2004). La FTCD est impliquée dans le métabolisme des folates. Cette enzyme exprimée exclusivement dans le foie, possède deux fonctions indépendantes : transférase et désaminase (MacKenzie et coll, 1980). L'enzyme FTCD possède une région N-terminale à activité formiminotransférase (FT) constituée de 1-324 acides aminés possédant un site de liaison pour le tetrahydrofolate (*THF binding*) et un acide aminé histidine (His) en position 82 qui est potentiellement un site actif du FT. Un domaine à activité cyclodésaminase (CD) est également présent en partie C-terminale. Ces deux domaines sont liés par une séquence de 10 acides aminés (Muratori et coll, 2001) (figure B). En microscopie électronique, cette enzyme est un octamère formé de 8 sous-unités identiques arrangées dans une structure circulaire (Beaudet et coll, 1976). Les anticorps LKM1 sont les marqueurs sérologiques de l'HAI de type 2. Toutefois, les auto-anticorps anti-LC1 peuvent néanmoins avoir un intérêt considérable dans le pronostic de la maladie puisque le titre des anticorps anti-LC1 corrèle avec le taux des aminotransférases chez les patients atteints d'HAI de type 2; Cette corrélation n'a pu être observée dans le cas des auto-anticorps anti-LKM1 (Muratori et coll, 1998). Le clone LCHC1 code pour un peptide de 146 acides aminés situé dans la région C-terminale de la protéine FTCD. Ce peptide est reconnu par tous les sérums de patients positifs pour anti-LC1 (détectés par immunofluorescence indirecte et/ou immunodiffusion). Ceci nous a permis de suggérer que cette région C-terminale contient l'épitope principal. En étudiant la réactivité entre les auto-anticorps anti-LC1 et l'auto-antigène FTCD de rat, les études de Muratori ont montré que les auto-anticorps LC1 reconnaissent différents épitopes conformationnels de l'auto-antigène FTCD de rat. Toutefois, cette réactivité disparaît quand la protéine FTCD de rat est dénaturée en Western blot (Muratori et coll, 2001). Lapierre et collaborateurs avaient montré que tous les sérums de patients anti-LC1

reconnaissent l'auto-antigène FTCD humain alors que seulement 40% de sérums anti-LC1 positifs reconnaissent la protéine de rat (Lapierre et coll, 2003). La différence de réactivité des anticorps anti-LC1, vis-à-vis des épitopes FTCD humain et de rat est due à la présence de certaines structures dans les sites antigéniques de la protéine FTCD humaine qui sont absentes chez les rongeurs. Une comparaison de séquences d'acides aminés entre l'enzyme FTCD humain et de rat a permis de montrer cette disparité (Mao Y et coll, 2004). Ainsi, il est important d'utiliser l'auto-antigène FTCD humain dans les tests de diagnostique pour détecter les auto-anticorps anti-LC1 présents dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 2. La cartographie des déterminants antigéniques de FTCD a montré qu'au moins deux régions discontinues sont reconnues par les auto-anticorps anti-LC1. La réponse auto-immune anti-LC1 est donc une réponse polyclonale, induite par un antigène FTCD endogène (Lapierre et coll, 2003). Nous avons vu que l'épitope du CYP2D6 reconnu par les anticorps anti-LKM1 présente une similitude de séquence d'acides aminés avec des protéines virales. Ceci suggère que le mécanisme de mimétisme moléculaire pourrait s'appliquer à l'auto-antigène FTCD. Une caractérisation des sites antigéniques de la protéine FTCD a permis d'identifier une similitude entre l'épitope dominant (dans la région d'acides aminés 428-434) de FTCD et une protéine du virus Herpes humain de type 6 (*Human Herpes Virus type 6, HHV-6*) (Lapierre et coll, 2003). D'autre part, une similitude de séquence d'acides aminés a été trouvée entre l'auto-antigène *UGA supprimeur tRNA associated protein* reconnu par les auto-anticorps SLA/LP et une protéine du virus HHV-6 (Wies, et coll, 2000, Costa, 2000). L'association entre les infections au virus HHV-6 et les hépatites auto-immunes a été observée chez les enfants (Schmitt et coll, 1996). Ce virus hépatotrope serait donc un bon candidat pour étudier les mécanismes induisant la réponse auto-immune chez les enfants atteints d'HAI.

Le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) est exprimé dans la membrane sinusoïdale des hépatocytes, et est ainsi exposé aux auto-

anticorps circulants. En utilisant différentes méthodes de dosage, les auto-anticorps anti-ASGP-R purifié à partir de foie de rat ou de lapin, ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'hépatopathies auto-immunes. Toutefois, la présence d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur humain est étroitement liée à l'HAI. Ces auto-anticorps sont présents dans le sérum de 88% de patients adultes atteints d'HAI et le titre de ces auto-anticorps semble être relié à l'activité inflammatoire de la maladie. Nous avons donc isolé la protéine à partir de foie humain et nous avons mis au point un test ELISA pour détecter les auto-anticorps anti-ASGP-R dans le sérum de patients juvéniles atteints d'HAI. Nous avons trouvé que la fréquence d'auto-anticorps anti-ASGP-R est plus élevée dans le sérum de patients atteints d'HAI de type 1 (75%) comparé aux patients atteints d'HAI de type 2 (40%). Ceci est probablement dû à la différence existant entre les mécanismes pathogéniques de ces deux types d'HAI. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les patients anti-ASGP-R positifs et les patients anti-ASGP-R négatifs concernant l'âge moyen, le taux d'aminotransférase et le ratio Femme/Homme. En revanche, nous avons trouvé une forte corrélation entre le titre d'auto-anticorps anti-ASGP-R et l'hypergammaglobulinémie. Cette corrélation a été observée dans le cas de patients adultes atteints d'HAI par Treichel et collaborateurs; le titre et la fréquence des auto-anticorps anti-ASGP-R est alors en corrélation avec l'activité inflammatoire. De plus, le titre de ces auto-anticorps diminue dans le sérum de patients traités aux immunosuppresseurs (Treichel et coll, 1990). Dans notre étude, tous les sérums de patients ont été prélevés avant tout traitement immunosuppresseur. Nous pouvons, par contre, suggérer que le titre d'auto-anticorps anti-ASGPR élevé (entre 1/1600 à 1/1000) dans le sérum de patients pédiatriques pourrait être considéré comme un indicateur de l'intensité de l'activité inflammatoire de la maladie. Ces résultats peuvent expliquer la prédominance de l'inflammation au niveau péri-portale souvent observée chez les patients atteints d'HAI (Mc Farlane et coll, 1990). Il a été

montré que suite à une perfusion de foie de rat par des anticorps polyclonaux anti-ASGP-R, des anticorps se fixent sur les cellules de foie de la région péri-portale produisant une hépatite d'interface; Ces études ont permis de suggérer que les auto-anticorps dirigés contre cette protéine pourrait participer à la réaction ADCC ou à d'autres réactions immunologiques entraînant un dommage du foie (McFarlane et coll, 1989). De plus, une corrélation a été trouvée entre le titre d'auto-anticorps anti-ASGP-R circulants et le taux du récepteur de l'interleukine IL-2 soluble (sIL-2R) chez les patients atteints d'HAI. Un traitement immunosuppresseur a permis une diminution du taux d'anticorps anti-ASGP-R circulants et de sIL-2R chez les patients (Dejica et coll, 1997). D'autres études ont montré que des clones de cellules T CD4⁺ isolées du sang périphérique ou de biopsies de foie de patients atteints d'HAI stimulent la production d'auto-anticorps dirigés contre l'ASGP-R par des cellules B autologues (Wen et coll, 1990). Toutes ces observations sont en faveur du rôle pathologique des auto-anticorps anti-ASGP-R dans l'hépatite auto-immune. Afin de mieux comprendre le mécanisme responsable de l'induction de cette réponse auto-immune, nous avons cherché à identifier le site antigénique de la protéine reconnue par les auto-anticorps anti-ASGP-R. Nous avons appliqué divers traitements à la protéine afin de caractériser les sites antigéniques reconnus par les auto-anticorps anti-ASGP-R. Les anticorps anti-ASGP-R présents dans le sérum de patients atteints d'HAI reconnaissent la protéine isolée à partir du foie et testée sous sa forme native en Slot blot. Par contre, ces auto-anticorps ne reconnaissent plus le complexe hétéro-oligomérique, dénaturée en Western-blot. Le sérum de lapin dirigé contre la séquence peptidique linéaire de la sous-unité H1 reconnaît la protéine purifiée à partir de foie humain aussi bien sous sa forme native (en slot-blot et en ELISA) que sous sa forme dénaturée en Western-blot. Donc, nous pouvons conclure que le site antigénique reconnu par les auto-anticorps anti-ASGP-R n'est pas une séquence linéaire du récepteur. Nous avons choisi les cellules HepG2 pour l'expression endogène du récepteur en se basant sur les

études antérieures de biosynthèse de la protéine effectuées dans cette lignée cellulaire. Le sérum de lapin a été utilisé pour l'immunoprécipitation de la protéine. Les cellules non-traitées exprimaient la protéine de poids moléculaire de 46 kD. Après un traitement des cellules par la tunicamycine, la protéine devient non-glycosylée et de poids moléculaire de 34 kD. Les cellules traitées par la monensine et la bréfeldine expriment une protéine non mature de 40 kD. Les auto-anticorps anti-ASGP-R présents dans le sérum de patients atteints d'HAI et testés en ELISA, ne précipitaient pas la protéine exprimée dans les cellules HepG2. Ces auto-anticorps réagissaient par contre avec la protéine marquée à l'iode et purifiée à partir de foie humain. L'ASGP-R est un complexe hétéro-oligomérique formé de deux sous-unités H1 et H2. Chacune de ces sous-unités possède des ponts disulfures. Dans le foie humain, le complexe hétéro-oligomérique ASGP-R a un ratio H1/H2 différent de celui dans les cellules HepG2 (Paietta et coll, 1992). La sous-unité H1 isolée à partir du foie a un poids moléculaire sur un gel d'acrylamide SDS inférieur à celle présente dans les cellules HepG2. La séquence peptidique est toutefois identique dans les deux types cellulaires. Une étude comparative de l'expression de l'ASGP-R dans les cellules HepG2 et les cellules de la lignée épithéliale intestinale humaine Caco2 a montré une différence de poids moléculaire de la protéine dans un gel SDS-PAGE. Cette différence disparaît après un traitement de la protéine par l'enzyme N-Glycosydase F (Mu et coll, 1994). Ainsi, on peut suggérer que l'absence de la réactivité des auto-anticorps vis-à-vis de la protéine exprimée dans les cellules HepG2, serait probablement liée aux chaînes de carbohydrates puisque, la déglycosylation de l'ASGP-R (isolé à partir de foie) par l'endoglycosydase F inhibe la formation de complexe immun entre les anticorps et la protéine mature. Par contre, la rupture des ponts disulfures de la molécule après traitement par le β -mercaptoéthanol, ne modifie pas sa reconnaissance par les anticorps. L'ASGP-R est considéré comme un régulateur physiologique du pool des glycoprotéines circulant. Une diminution de l'activité de l'ASGP-R provoquant une

hyperasialoglycoprotéinémie a été constatée chez les patients présentant un carcinome hépatique ou une cirrhose (Sawamura et coll, 1984). Il est en effet connu que les auto-anticorps dirigés contre certains récepteurs peuvent provoquer des maladies en les stimulant ou en bloquant la fonction comme dans le cas de la maladie de Basedow et de la myasthénie. Ainsi, après liaison du récepteur des asialoglycoprotéines à son ligand (ASF), les auto-anticorps anti-ASGP-R reconnaissent toujours ce complexe, suggérant que les sites antigéniques de l'ASGP-R reconnus par les auto-anticorps ne sont pas situés au site de liaison du ligand. Nous pouvons conclure que dans le sérum de patients atteints d'HAI, les auto-anticorps anti-ASGP-R sont dirigés contre des sites antigéniques conformationnels de la structure hétéro-oligomérique de la protéine mature isolée à partir de foie humain. Pour certaines protéines, la structure quaternaire est nécessaire pour sa reconnaissance par les auto-anticorps; La protéine octamérique FTCD présentée sous forme libre dans le cytosol ou associée à la membrane golgienne, est en effet reconnue par les auto-anticorps anti-LC1. Ces auto-anticorps amplifient la formation du complexe h-FTCD-Golgi permettant probablement une stabilité de la structure (Renous et coll, 2004). Nos résultats montrent que les sites conformationnels de l'auto-antigène ne sont pas seulement des séquences peptidiques, ils renferment aussi des chaînes de carbohydrates. Les chaînes des carbohydrates de l'ASGP-R exposées du côté extracellulaire de la membrane des hépatocytes font partie des épitopes et sont donc accessibles aux auto-anticorps circulants.

Des xénobiotiques peuvent induire un tableau clinique et biologique semblable à une hépatite auto-immune. Ainsi, nous rapportons ici le cas d'une adolescente atteinte d'une hépatite induite par la minocycline après un traitement contre l'acné. Nous avons montré la présence dans le sérum de cette patiente des auto-anticorps dirigés contre différentes protéines des hépatocytes, surtout des cytochromes P450, qui sont responsables du métabolisme de la plupart des xénobiotiques. L'antigène pourrait être un des métabolites réactifs de la minocycline qui pourrait soit se fixer sur des

protéines tissulaires soit sur des enzymes qui catalysent sa biotransformation induisant la formation des néo-antigènes. Plusieurs points restent à résoudre dans le cas d'hépatite induite par la minocycline. La première question qui se posait était l'identité de l'auto-antigène cible dans l'hépatite immune induite par la minocycline. Cet auto-antigène pouvait être un des métabolites réactifs de la minocycline comme dans le cas des hépatites induites par l'halothane. La présence d'anticorps dirigés contre le principal métabolite de l'halothane, l'acide trifluoroacétique, a en effet été rapportée dans le sérum de patients atteints d'hépatite à l'halothane (Satoh et coll, 1985). Nous avons montré la présence d'anticorps dirigés contre deux protéines de 50 et 90 kD exprimées dans les cellules HepG2 dans le sérum de cette patiente; Il serait intéressant d'identifier ces deux protéines et d'étudier leur implication dans le métabolisme de la minocycline. L'auto-antigène impliqué dans l'hépatite induite par la minocycline pourrait simplement être l'enzyme catalysant la bio-transformation de la minocycline. Ceci est le cas de l'hépatite induite par l'acide tiénilique, la dihydralazine et l'halothane qui sont caractérisées par la présence d'auto-anticorps dirigés contre CYP2C9, CYP2A1 et CYP2E1, respectivement. La fraction microsomale de foie de rat et les cytochromes purifiés CYP3A6 et CYP2C4 sont reconnus en ELISA par les auto-anticorps présents dans le sérum de la patiente. Nous pouvons donc suggérer que cette hépatite induite par la minocycline serait le résultat d'un mécanisme semblable aux cas d'hépatite induite par l'acide tiénilique, de la dihydralazine et de l'halothane. La minocycline est utilisée depuis longtemps dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, mais les effets immuno-allergiques n'ont pas été rapportés chez ces patients (Tilley et coll, 1995). De plus, la plupart des patients qui développent une hépatite immune induite par la minocycline ont été traités contre l'acné ou le lupus. Ceci pourrait être lié à l'existence d'un gène qui prédispose ces patients à cette hépatite. Il sera très important d'identifier les sujets à risque de développer une hépatite induite par la minocycline.

Conclusion

La présence d'auto-anticorps est un élément essentiel du diagnostic de l'HAI qui doit être interprété en fonction du contexte clinique, des données biologiques, histologique, des sérologies virales et des prises médicamenteuses. Des auto-anticorps peuvent aussi servir pour l'étude immunologique de la distribution de la molécule cible dans les cellules et les tissus, ce qui apporte souvent des renseignements sur la pathogenèse de la maladie. Nos études ont caractérisé la réponse auto-immune dirigée contre CYP2D6 dans les HAI de type 2 et ont permis d'affirmer que cette réponse est polyclonale et entretenue par l'auto-antigène lui-même. De nombreux points restent encore à éclaircir comme le rôle pathologique des anticorps anti-LKM1 dans l'HAI de type 2. L'identification de l'auto-antigène FTCD en tant qu'auto-antigène cible des auto-anticorps anti-LC1 est une étape importante dans le diagnostic de l'HAI de type 2, surtout dans le cas où les anticorps anti-LC1 sont les seuls marqueurs sérologiques. Les résultats de cette thèse ont permis aussi de proposer des nouvelles méthodes de diagnostic plus simples et plus spécifiques que celle dont nous disposions jusqu'alors. Nous avons identifié un site antigénique conformationnel de l'ASGP-R reconnu par les auto-anticorps anti-ASGP-R qui est présent dans le domaine extracellulaire de la molécule et est ainsi accessible aux auto-anticorps circulants. L'ensemble de nos travaux suggèrent que les auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints d'HAI sont dirigés le plus souvent contre des structures conformationnelles de l'auto-antigène (en particulier dans le cas du CYP2D6, ASGP-R). Ainsi, il est important de tester l'auto-antigène sous une forme native afin de détecter les auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints d'HAI. L'épitope peut être une chaîne de carbohydrate comme c'est le cas de l'ASGP-R. En utilisant les auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints d'HAI, il a été possible de détecter des protéines recombinantes exprimées chez la bactérie. Cette technique est très performante, mais il est indispensable de

montrer que la protéine ne nécessite pas de modification post-traductionnelle pour être reconnue par les auto-anticorps. Dans le cas contraire, le choix du système eucaryote devient nécessaire.

Table 1 : Comparaison d'épitopes linéaires reconnus par les sérums de patients LKM1+/HCV- et LKM1+/HCV+.

Séquences d'acides aminés	LKM1+/HCV-	LKM1+/HCV+
254-271 [#]	+	-
321-351	+	-
373-389	+	-
410-429	+	-
200-214	-	+
321-339*	+	+
193-212	+	+

Cette séquence contient le site antigénique principal reconnu par :

Sérums de patients LKM1+/HCV-

* sérums de patients LKM1+/HCV+

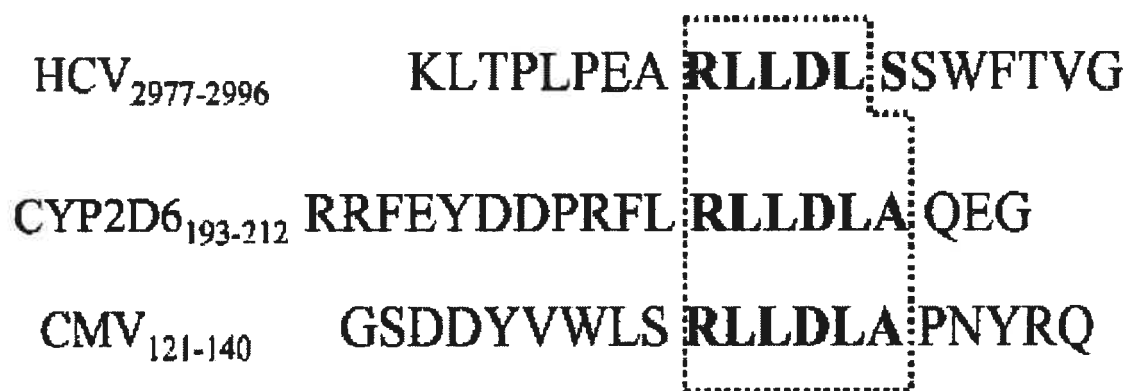


Figure A. Similitude de séquences d'acides aminées entre l'auto-antigène CYP2D6 et les pathogènes infectieux impliqués dans l'auto-immunité hépatique. D'après Kerkar et coll, 2003. HCV: Virus C de l'hépatite, CMV: Cytomégalovirus.

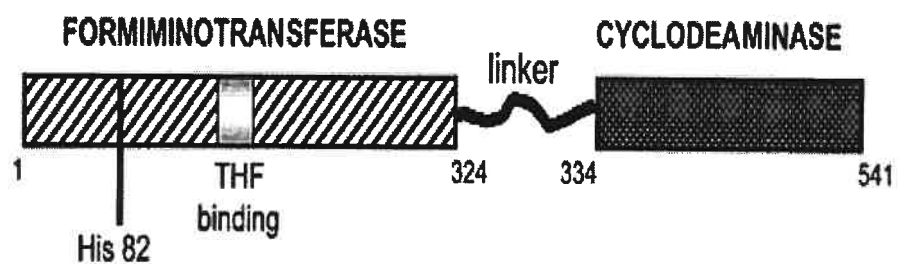


Figure B : Organisation structurale du FTCD

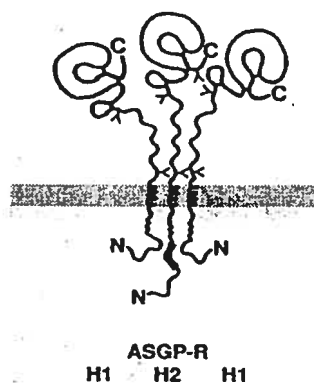


Figure C: Structure schématique du récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R)

Bibliographies

- Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Martini E, Soulier E, Laperche S, Homberg J-C. Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;16:892-898.
- Abuaf N, Lunel F, Giral P, Borotto E, Laperche S, Poupon R, Opolon P, Huraux JM, Homberg JC. Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *J Hepatol.* 1993;18(3):359-64.
- Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, Kreibich G. Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1985;161:1231-1236.
- Alvarez F, Martes P, Maggiore G, Bernard O and Dussaix E. False-positive result of hepatitis C enzyme-linked immunoabsorbant assay in children with autoimmune hepatitis. *J Pediatr* 1991;119:75-77.
- Amar-Costesec AH, Beaufay M, Wibo D, Thines-Sempoux E, Feytmans E, Robbi M, Berthet J. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. Preparation and composition of the microsomal fraction. *J Cell Biol* 1974;61:201-212.
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the AIRE protein. *Science* 2002;298:1395-401.
- Annacker O, Pimenta-Araujo R, et al. CD4+CD25+ immunoregulator Tcells suppress polyclonal T cell regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001;166: 3008-3018.
- Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982;51:531-54.
- Ausubel FM, et al. Current protocols in molecular biology (John Wiley & Sons, inc) 1995;4.2.4-4.2.5
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- Bashour AM, Bloom GS. 58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. *J Biol Chem* 1998;273(31):19612-7.
- Beaudet R, Mackenzie RE. Formiminotransferase cyclodeaminase from porcine liver. An octomeric enzyme containing bifunctional olypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1976;453:151-61.
- Beaune P, Pessayre D, Dansette P, Mansuy D, Manns M. Autoantibodies against cytochromes P450: role in human diseases. *Adv Pharmacol* 1994;30:199-245.
- Beaune PH, Bourdi M. Autoantibodies against cytochromes P-450 in drug-induced autoimmune hepatitis. *Ann N Y Acad Sci* 1993;685:641-5.

- Beaune PH. Human cytochromes P450. Applications in pharmacology. *Therapie* 1993;48(6):521-6.
- Beland K, Lapierre P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Autoimmun* 2004;22(2):159-66.
- Bischoff J, Libresco S, Shia MA, Lodish HF. The H1 and H2 polypeptides associate to form the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *J Cell Biol* 1988;106:1067-74.
- Bischoff J, Lodish HF. Two asialoglycoprotein receptor polypeptides in human hepatoma cells. *J Biol Chem* 1987;262(24):11825-32.
- Bock KW, Bock-Hennig BS, Fischer G, Lilienblum W, Schirmer G. UDP-glucuronyltransferases and their toxicological significance. *Adv Exp Med Biol* 1986;197:171-84.
- Bocker R, Estler CJ, Ludewig-Sandig D. Evaluation of the hepatotoxic potential of minocycline. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1434-6.
- Bortolotti F, Vajro P, Balli F, Giaccho R, Crivellaro C, Barbera C and al. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J hepatology* 1996;25:614-620.
- Boudreaux JP, Hayes DH, Mizrahi S, Hussey J, Regenstein F, Balart L. Fulminant hepatic failure, hepatorenal syndrome, and necrotizing pancreatitis after minocycline hepatotoxicity. *Transplant Proc* 1993;25(2):1873.
- Bourdi M, Gautier JC, Mircheva J, Larrey D, Guillouzo A, Andre C, Belloc C, Beaune PH. Anti-liver microsomes autoantibodies and dihydralazine-induced hepatitis: specificity of autoantibodies and inductive capacity of the drug. *Mol Pharmacol* 1992;42(2):280-5.
- Bourdi M, Larrey D, Nataf J, Bernuau J, Pessayre D, Iwasaki M, Guengerich FP, Beaune PH. Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *J Clin Invest* 1990;85(6):1967-73.
- Bourdi M, Tinel M, Beaune PH, Pessayre D. Interactions of dihydralazine with cytochromes P4501A: a possible explanation for the appearance of anti-cytochrome P4501A2 autoantibodies. *Mol Pharmacol* 1994;45(6):1287-95.
- Burette A, Finet C, Prigogine T, DeRoy G, Deltenre M. Acute hepatic injury associated with minocycline. *Arch Int Med* 1984;144:1491-1492.
- Butler LE, Thomassen D, Martin JL, Martin BM, Kenna JG, Pohl LR. The calcium-binding protein calreticulin is covalently modified in rat liver by a reactive metabolite of the inhalation anesthetic halothane. *Chem Res Toxicol* 1992;5(3):406-10.

- Ciccarelli E, Alonso MA, Cresteil D, Bollen A, Jacobs P, Alvarez F. Intracellular retention and degradation of human mutant variant of α 1-antitrypsin in stably transfected Chinese hamster ovary cell lines. *Eur J Biochem* 1993;213:271-6.
- Codoner-Franch P, Ordinana V, Gasco E, Villarbe J and Alvarez F. Anti-rat liver microsomal and cytosolic antibodies in hepatitis C virus infection. *Autoimmunity* 1994;17:89-97.
- Codoner-Franch P, Paradis K, Gueguen M, Bernard O, Amar-Costesec, Alavarez F. A new antigen recognized by anti-liver-kidney-microsome antibody (LKMA). *Clin Exp Immunol* 1989;75:354-358.
- Colucci G, Colombo M, Del Ninno E, Paronetto F: In situ characterisation by monoclonal antibodies of the mononuclear cell infiltrate in chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1983;85:1138-45.
- Combes B, Whalley PJ, Adams RH: Tetracycline and the liver: Clinical manifestations of tetracycline toxicity. *Prog Liver Dis* 1972;4: 589-596.
- Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2000;121:364-74.
- Cousins MJ, Plummer JL, Hall PD. Risk factors for halothane hepatitis. *Aust N Z J Surg* 1989;59(1):5-14.
- Crivelli O, Lavarini C, Chiiaberge E, Amoroso A, Farci P, Negro F et al. Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta agent. *Clin Exp Immunol* 1983;54:232-8.
- Czaja A. classification of autoimmune hepatitis and the significance of autoantibodies in pathogenesis and diagnosis, *AASLD, Liver injury update* 1997;95-105.
- Czaja AJ, Carpenter HA: Validation of scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996;41:305-314.
- Czaja AJ, et al. Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92 (12):2197-200.
- Czaja AJ, Pfeifer KR, Decker RH, Vallari AS. Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996;41:1733-40.
- Dansette PM, Bonierbale E, Minoletti C, Beaune PH, Pessayre D, Mansuy D. Drug-induced immunotoxicity. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1998; 23(4):443-51.
- Davies MG, Kersey PJ. Acute hepatitis and exfoliative dermatitis associated with minocycline. *BMJ* 1989;298:1523-4.

- Dayer P, Leemam T, Striberi R. Dextromethorphan O-demethylation in the liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P450db1 activity. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:34-40.
- Dejica D, Treichel U, Par A, Chira O, Meyer zum Buschenfelde KH. Anti asialoglycoprotein receptor antibodies and soluble interleukin-2 receptor levels as marker for inflammation in autoimmune hepatitis. *Z Gastroenterol* 1997;35(1):15-21.
- Dieckemann D, Plottner H, et al. Ex vivo isolation of CD4+CD25+ T cells with regulator properties from human blood. *J exp Med* 2001;193:1303-1310
- Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vittozi S, Alvarez F. Dna Vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: A transgenic model of autoimmune hepatitis. *The journal of immunology* 2002;169:4889-4896
- Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2001;62(12):1356-62.
- Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol* 2004;40(6):904-9.
- Doherty DG, Donaldson PT, UnderhillJA, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994;19:609-615.
- Dollery C, ed. *Therapeutic drugs*. London: Churchill Livigston 1991.
- Donalson Pt, Doherty DG, Hayllar KM, et al. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis : human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factor. *Hepatology* 1991;13:701-706.
- Duclos-Vallée J.C, Hajoui O, Yamamoto A.M, Jacqz-Aigrain E and Alvarez F. Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by liver-kidney microsomal antibodies. *Gastroenterology* 1995;108:470-6.
- Durazzo M, Philip T, Van Pelt F.N.A, Lutiig B et al. Heterogeineity of liver-kidney microsomal autoantibodies in chronic hepatitis C and D virus. *Gastroenterology* 1995;108:455-462.
- Dussaix E, Maggiore G, De Giacomo C, Mondelli M, Martres P and Alvarez F. Autoimmune hepatitis in children and hepatitis C virus testing. *Lancet* 1990;335:1160-1161.
- Eliasson E, Kenna JG. Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol Pharmacol* 1996;50(3):573-82.
- Elkayam O, Yaron M, Caspi D. Minocycline-induced autoimmune syndromes: an overview. *Semin Arthritis Rheum* 1999;28(6):392-7.
- Ermann J and Fathamn CG. Autoimmune diseases:gene, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* 2001;9: 759-61.

- Gatti G, Cavallo R, Sartori ML, et al. Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity. *J steroid Biochem* 1987;26:49-58.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV. Human cytochromes P450: evolution and cDNA-directed expression. *Environ Health Perspect* 1992;98:81-5.
- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988 4;331(6155):442-6.
- Gonzalez FJ. Control of constitutively-expressed developmentally-activated rat hepatic cytochrome P450 genes. *Keio J Med* 1992;41(2):68-75.
- Gough A, Chaman S, Wastaff k, et al. Minocycline-induced autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus-like syndrome. *Br med J* 1996;312:169-172.
- Gregorio GV, Portmann B, Reid F, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: A 20 years experience. *Hepatology* 1997;25: 541-7.
- Gueguen M, Boniface O, Bernard O, Clerc F, Cartwright T, Alvarez F. Identification of the main epitope on human cytochrome P450IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *J Autoimm* 1991;4:607-615.
- Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 1988;168:801-806.
- Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db 1. *Biochem Biophys Res Comm* 1989;159:542-547.
- Guengerich FP, Liebler DC. Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *Crit Rev Toxicol* 1985;14(3):259-307.
- Guldner HH, Netter HJ, Szosteki C, Lakomek HJ, Will H. Epitope mapping with a recombinant human 68-kDa (U1) ribonucleoprotein antigen reveals heterogenous autoantibody profiles in human autoimmune sera. *J Immunol* 1988;141:469-475.
- Hajoui O, Martin S, Alvarez F. Study of antigenic sites on the asialoglycoprotein receptor recognized by autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1998;113:339-346
- Han S, Tredger M, Gregorio GV, Mieli-Vergani G, Vergani D. Anti-liver antigen type 1 (LC1) antibodies in childhood autoimmune liver disease. *Hepatology* 1995;21:58-62
- Harlow E, Lane D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988:78-137.

- Hennig D, Scales SJ, Moreau A, Murley LL, De Mey J, Kreis TE. A formiminotransferase cyclodeaminase isoform is localized to the Golgi complex and can mediate interaction of trans-Golgi network-derived vesicles with microtubules. *J Biol Chem* 1998;273(31):19602-11.
- Hiasa Y, Akbar F, Abe M, et al. Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases : decreased expression oh HLA DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepatology Research* 2002;22:241-249.
- Hodges S, Lobo-Yeo A. Donaldson P and al. Autoimmune chronic active hepatitis in a family. *Gut* 1991;32:299-302.
- Homberg J-C, Abuaf N, Bernard O, et al. Chronic active hepatitis associated with anti-liver/kidney microsome antibody type 1: A second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-9.
- Homberg JC, André C. Abuaf N. A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM2) in tienilic acid-induced hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1984;55:561-570.
- Homberg JC. Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(2):551-5.
- Hong W, Le AV, Doyle D. Identification and characterization of a murine receptor for galactose-terminated glycoproteins. *Hepatology* 1988;8:553-8.
- Hudgin R, Pricer WE, Ashwell G, Stockert R, Morell AG. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* 1974;17: 5536-43.
- Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962;194:495-6.
- Jacqz-Aigrain E, Gueguen M, Zanger UM, Robieux I, Alvarez F. Cytochrome P450IID subfamily in non-human primates. Catalytical and immunological characterization. *Biochem Pharmacol* 1991;11:1657-1663.
- Jacqz-Aigrain E, Laurent J, Alvarez F. Dextromethorphan phenotypes in paediatric patients with autoimmune hepatitis. *Br J Clin Pharmacol* 1990;30:153.
- Jaqz-Aigrain E, Dulac H, Mathieu H. Phenotyping polymorphic drug metabolism in the french caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol* 1988;35:167-171.
- Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993;18:998-1005.
- Kakumu S, Arakawa Y, Goji H, Kashio T, Yata K. Occurrence and significance of antibody to liver-specific membrane lipoprotein by double-

antibody immunoprecipitation method in sera of patients with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1979;76:665-72.

- Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Antimicrobial agents: tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limberd LE, (eds). 9th ed. New York, Mc Graw-Hill, 1996 :1124-1130.
- Kawasaki T, Ashwell G. Carbohydrate structure of glycopeptides isolated from an hepatic membrane-binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* 1976;251:5292-9.
- Kenna JG, Jones RM. The organ toxicity of inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 1995;81(6 Suppl):S51-66.
- Kenna JG, Martin JL, Satoh H, Pohl LR. Factors affecting the expression of trifluoroacetylated liver microsomal protein neoantigens in rats treated with halothane. *Drug Metab Dispos* 1990;18(5):788-93.
- Kenna JG, Neuberger J, Williams R. Evidence for expression in human liver of halothane-induced neoantigens recognized by antibodies in sera from patients with halothane hepatitis. *Hepatology* 1988;8(6):1635-41.
- Kenna JG, Neuberger J, Williams R. Identification by immunoblotting of three halothane-induced liver microsomal polypeptide antigens recognized by antibodies in sera from patients with halothane-associated hepatitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;242(2):733-40.
- Kenna JG, Neuberger J, Williams R. Specific antibodies to halothane-induced liver antigens in halothane-associated hepatitis. *Br J Anaesth* 1987;59(10):1286-90.
- Kenna JG, Satoh H, Christ DD, Pohl LR. Metabolic basis for a drug hypersensitivity: antibodies in sera from patients with halothane hepatitis recognize liver neoantigens that contain the trifluoroacetyl group derived from halothane. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245(3):1103-9.
- Kenna JG. Halothane hepatitis in children. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;295(6601):783.
- Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Cytochrome P4502D6 (193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease
- Klein L, Kyewski B. Promiscuous expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med* 2000;78:483-94.

- Knight TL, Scatchard KM, Van Pelt FN, Kenna JG. Sera from patients with halothane hepatitis contain antibodies to halothane-induced liver antigens which are not detectable by immunoblotting. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270(3):1325-33.
- Knights KM, Gourlay GK, Cousins MJ. Changes in rat hepatic microsomal mixed function oxidase activity following exposure to halothane under various oxygen concentrations. *Biochem Pharmacol* 1987;36(6):897-906.
- Knights KM, Gourlay GK, Hall PD, Adams JF, Cousins MJ. Halothane hepatitis in an animal model: time course of hepatic damage. *Br J Exp Pathol* 1987;68(5):613-24.
- L Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M and Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998.
- Landini MP, Bianchi FB. Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 2001;34(3):494-501.
- Lando G, Berzofsky JA, Reichlin M. Antigenic structure of sperm whale myoglobin:I. Partition of specificities between antibodies reactive with peptide and native protein. *J Immunol* 1982;129:206-211.
- Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 2004;39(4):1066-74.
- Lapierre P, Hajoui O, Homberg J-C, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643-649.
- Lapierre P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol* 2003;33(7):1869-78.
- Laver WG, Air GM, Webster RG and Smith-Grill SJ. Epitope on protein antigens: Misconception and realities. *Cell* 1990;61:553.
- Lecoeur S, Andre C, Beaune PH. Tienilic acid-induced autoimmune hepatitis: anti-liver and-kidney microsomal type 2 autoantibodies recognize a three-site conformational epitope on cytochrome P4502C9. *Mol Pharmacol* 1996;50(2):326-33.
- Lecoeur S, Bonierbale E, Challine D, Gautier JC, Valadon P, Dansette PM, Catinot R, Ballet F, Mansuy D, Beaune PH. Specificity of in vitro covalent binding of tienilic acid metabolites to human liver microsomes in relationship to the type of hepatotoxicity: comparison with two directly hepatotoxic drugs. *Chem Res Toxicol* 1994;7(3):434-42

- Lecoœur S, Gautier JC, Belloc C, Gauffre A, Beaune PH. Use of heterologous expression systems to study autoimmune drug-induced hepatitis. *Methods Enzymol* 1996;272:76-85.
- Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U, Zauli D and Bianchi F.B. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990;335:258-59.
- Liston A, Lesage S, Wilson J et al. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 2003;4:350-4.
- Lobo Yeo A, Alvigii L, Mieli-vergani G, et al. Preferential activation of helper/inducer T lymphocytes in children with autoimmune chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1987;67:95-104.
- Lobo Yeo A, Senaldi G, Portmann B, et al. Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes. A study in children with liver disease. *Hepatology* 1990;12:224-232.
- Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, Ballet F, Feldmann G, Guengerich FP, Pessayre D. Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 1993;104(1):203-16.
- Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Feldmann G, Larrey D, Pessayre D. Presence of functional cytochrome P-450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology* 1990;11(5):850-8.
- Lohr H, Manns M, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Trautwein C, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1991;84:297-302.
- Lohr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH. Liver-infiltrating T helper cells in autoimmune chronic active hepatitis stimulate the production of autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor in vitro. *Clin Exp Immunol* 1992;88:45-9.
- Lohr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. The human hepatic asialoglycoprotein receptor is a target antigen for liver-infiltrating T cells in autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990;12:1314-20.
- Longhi MS, Ma Y. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2004; 4:31-7.
- Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, Bogdanos DP, Heneghan M, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005;25(1):63-71.
- Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1959;193:265-79.

- Lunel F, Abuef N, Frangeul L, Gripon P, Perrin M, Le Coz Y , et al. Liver-kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992;16:630-6.
- Ma Y, Peakman M, Lobo-Yeo A, Wen L, Lenzi M et al. Differences in immune recognition of cytochrome P4502D6 by liver kidney microsomal (LKM) antibody in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1994;97:94-99.
- Mackay IR, Tait DB. HLA associations with autoimmune type chronic active hepatitis : Identification of B3-DRW3 haplotype by famiy studies. *Gastroenterology* 1980;79:95-98.
- MacKenzie RE, Aldridge M, Paquin J. The bifunctional enzyme formiminotransferase-cyclodeaminase is a tetramer of dimers. *J. Biol. Chem* 1980;255:9474-9478.
- Mackie F.D, Peakman M, Yun M, Sallie R, Smith H, Davies E.T, Mieli-Vergani G and Vergani D. Primary and secondary liver/kidney microsomal auutoantibody response following infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 1994;106:1672-1675.
- Maggiore G, Alvarez F, Bernard O (1993) Autoimmune chronic hepatitis. In: Buts J-P, Sokal EM (eds) *Management of digestive and liver disorders in infants and children*. Elsevier, Amsterdam, 1993;567-75.
- Maggiore G, Bernard O, Homberg J_G, Hadchouel M, Alvarez F, Hadchouel P, Odievre M, alagille D. Liver disease associated with anti-liver kidney microsome antibody in children. *J Pediatr* 1986;108:399-401.
- Maggiore G, Weber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg J-C, Alvarez F, Hadchouel P, Alagille D. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 1993;17:376-381.
- Malcolm A, Heap TR, Eckstein RP, Lunzer MR: Minocycline-induced liver injury. *Hepatology* 1995;22: 452A.
- Mallat A, Dhumeaux D. Mechanisms of drug-induced hepatitis. *Rev Prat* 1990;40(29):2728-31.
- Manns M, Kawakami H, Meyer zum Buschenfelde KH. Liver membrane antigen-targets of humoral and cell mediated immunity in chronic active hepatitis. *Hiroshima J Med Sci* 1980;29(2):41-7.
- Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH, Hess G. Autoantibodies against liver-specific membrane lipoprotein in acute and chronic liver diseases: studies on organ-, species-, and disease-specificity. *Gut* 1980;21:955-61.
- Manns M, Zanger U, Gerken G, Sullivan KF, Meyer Zum Bfschenfelde KH, Meyer UA, Eichelbaum M. Patients with type II autoimmune hepatitis

express functionally intact cytochrome P450db1 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro but not in vivo. *Hepatology* 1990;12:127-132.

– Manns M.P, Griffin K.J, Sullivan K.F and Johnson E.F. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J. Clin. Invest* 1991;88:1370-1378.

– Manns MP, and Kruger. Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1994;106(6):1676-97.

– Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450 db1. *J Clin Invest* 1989;83:1066-1072.

– Mao Y, Vyas NK, Vyas MN, Chen DH, Ludtke SJ, Chiu W, Quijcho FA. Structure of the bifunctional and Golgi-associated formiminotransferase cyclodeaminase octamer. *EMBO J.* 2004;23(15):2963-71.

– Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand J, Johanet C, Homberg J-C. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662-1666.

– Mc Farlane BM, Mc Sorley CG, Vergani D, Mc Farlane IG, Williams R. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol* 1986;3: 196-205.

– Mc Farlane BM, Spos J, Gove CD, Mc Farlane IG, Williams R. Antibodies against the hepatic asialoglycoprotein receptor perfused in situ preferentially attach to periportal liver cells in the rat. *Hepatology* 1990;11;408-15.6. 13.

– Mc Farlane I.G, Smith H.M, Johnson P.J, Bray G.P, Vergani D and Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? *Lancet* 1990;335:754-757.

– Mc Farlane IG, Mc Farlane BM, Major GN, Tolley P, Williams R. Identification of the hepatic asialoglycoprotein receptor (hepatic lectin) as a component of liver specific membrane lipoprotein (LPS). *Clin Exp Immunol* 1984;55:347-54.

– McFarlane BM, McSorley CG, McFarlane IG, Williams R. A radioimmunoassay for detection of circulating antibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein. *J Immunol Methods* 1985;77:219-28.

– McFarlane IG. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Biomed & Pharmacother* 1999;53:255-63.

– McMillan R, Longmire R, Yelenosky R. the effect of cortisteroides on human IgG synthesis. *J Immunol* 1976;116:1592-5.

- Meyer zum Buschenfelde KH, Treichel U, Lohr H, Fleischer B, Poralla T. Human asialoglycoprotein receptor as an autoantigen in chronic hepatitis. *Immunol Res* 1991;10:497-502.
- Meyer zum Buschenfelde KH. Liver cell damage caused by monoclonal antibody against an organ-specific membrane antigen in vivo and in vitro. *J Hepatol* 1987;4:373-80.
- Meyer zum Buschenfelde, Miescher PA. Liver specific antigens. Purification and characterization. *Clin Exp Immunol* 1972;10:89-102.
- Mieli-Vergani G, Vergani D. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005;25(1):63-71.
- Min ID, Burke PA, Lewis WD, Jenkins RL: Acute hepatic failure associated with oral minocycline: a case report. *Pharmacotherapy* 1992;12:68-725.
- Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi F B. Liver/Kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721-726
- Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Manotti P, Lenzi M, Cassani F, Bianchi F B. Detection of anti-liver cytosol antibody type 1 (anti-LC1) by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting: comparison of different techniques. *Journal of immunological Methods* 1995;187:259-264.
- Muratori L, Lenzi M, Ma Y, Cataleta M, Mieli-Vergani G, Vergani D and Bianchi F.B. Heterogeneity of liver-kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease. *Gut* 1995;37:406-412.
- Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, Lenzi M, Landini MP, Albano E, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000;46(4):553-61.
- Murley LL, Mejia NR, MacKenzie RE. The nucleotide sequence of porcine formiminotransferase cyclodeaminase. *J. Biol. Chem* 1993;268:22820-228.
- Myachi K, Gupta TC, Dickson ER, et al. Precipitating antibodies to mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1980;39:599-606.
- Nebert DW. Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol Endocrinol* 1991;5(9):1203-14.

- O'Brien CJ, Vento S, Donaldson PT, McSorley CG, McFarlane IG, Williams R,
- Odievre AM, Maggiore G, Homberg JC, Saadoun F, Couroucé AM, Yrurt J, Hadchouel M, Alagille D. Seroimmunologic classification of chronic hepatitis in 57 children. *Hepatology* 1983;3:407.
- Paietta E, Stockert RJ, Racevskis J. Differences in the abundance of variably spliced transcripts for the second asialoglycoprotein receptor polypeptide, H2, in normal and transformed human liver. *Hepatology* 1992;12:395-402.
- Paradis K, Dib A, Homberg JC, Bernard O, Alagille D, Alvarez F. Detection of anti-endoplasmic reticulum antibody-positive autoimmune hepatitis in children, using an ELISA technique. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:816-22.
- Perez N, Herzog D, Jacqz-Aigrain E, Homberg J-C and Alvarez F. Study of the B cell response to cytochrome P450IID6 in sera from chronic hepatitis C patients. *Clin Exp Immunol* 1996;106:336-343.
- Pessayre D. Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis. *J Hepatol* 1995;23 Suppl 1:16-24.
- Pitkanen I, Peterson P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immunol* 2003;4:12-21.
- Poralla T, Manns M, Dienes HP, Dippold W, Hutteroth TH, Meyer zum Buschenfelde KH. Analysis of liver-specific protein LSP using murine monoclonal antibodies. *Eur J Clin Invest* 1987;17:360-7.
- Poralla T, Treichel U, Lohr H, Fleischer B. The asialoglycoprotein receptor as target structure in autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis* 1991;11:215-22.
- Poralla T. Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993;19:55-63.
- Prince HE, Ehenger RB, Dorey FJ, et al. Azathioprine suppression of antural killer activity and antibody-dependant cellular cytotoxicity in renal transplant recipient. *J Clin Immunol* 1984;4:312-8.
- Pumford NR, Martin BM, Thomassen D, Burris JA, Kenna JG, Martin JL, Pohl LR. Serum antibodies from halothane hepatitis patients react with the rat endoplasmic reticulum protein ERp72. *Chem Res Toxicol* 1993;6(5):609-15.
- Randen I, Pascual V, Victor K, Thompson KM, Forre O, Capra JD, Natvig JB. Synovial IgG rheumatoid factors show evidence of an antigen-driven immune response and a shift in the V gene repertoire compared to IgM rheumatoid factors. *Eur J Immunol* 1993;23:1220-1225.

- Ray DC, Drummond GB. Halothane hepatitis. *Br J Anaesth* 1991;67(1):84-99.
- Renous R, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. Characterization of the antigenicity of the formiminotransferase-cyclodeaminase in type 2 autoimmune hepatitis. *Exp Cell Res* 2004;292:332-41.
- Rich KM, Sesardic D, Foster JR, Davies DS, Boobis R: Immunohistochemical localization of cytochrome p450b/e in hepatic and extrahepatic tissues of the rat. *Biochemical Pharmacology* 1989;38:3305-3322.
- Rizzeto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and others disorders. *Clin Exp Immunol* 1973;15:331-344.
- Robin MA, Le Roy M, Descatoire V, Pessayre D. Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *J Hepatol* 1997;26 Suppl 1:23-30.
- Rowley MJ, McNeillage LJ, Armstrong JM, Mackay IR. Inhibitory autoantibody to a conformational epitope of the pyruvate dehydrogenase complex, the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60:356-370.
- Rowley MJ, McNeillage LJ, Armstrong JM and Mackay IR. Inhibitory autoantibody to a conformational epitope of the pyruvate dehydrogeases complex, the major auto-antigen in primary biliary cirrhosis. *Cli Immunol Immunopath* 1991;60:356-370.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-otlerance maintained by activated T cells expressing Il-2 receptor alpha (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning — A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 1989;12:16-12.20.
- Satoh H, Fukuda Y, Anderson DK, Ferrans VJ, Gillette JR, Pohl LR. Immunological studies on the mechanism of halothane-induced hepatotoxicity: immunohistochemical evidence of trifluoroacetylated hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;233(3):857-62.
- Satoh H, Gillette JR, Davies HW, Schulick RD, Pohl LR. Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome P-450 in the liver of halothane-treated rats. *Mol Pharmacol* 1985;28(5):468-74.
- Satoh H, Martin BM, Schulick AH, Christ DD, Kenna JG, Pohl LR. Human anti-endoplasmic reticulum antibodies in sera of patients with halothane-induced hepatitis are directed against a trifluoroacetylated carboxylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(1):322-6.

- Sawamura T, Nakada H, Hazama H, Shiozaki Y, Sameshima Y, Tashiro Y. Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. Asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma. *Gastroenterology* 1984;87:1217-21.
- Sawamura T, Shiozaki Y. Mechanism and clinical relevance of elevated levels of circulating asialoglycoproteins. *Targeted Diagn Ther* 1991;4:215-34.
- Schmitt K, Deutsch J, Tulzer G, Meindi R, Aberle S. Autoimmune hepatitis and adrenal insufficiency in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet* 1996;348(9032):966.
- Schwartz AL, Rup D. Biosynthesis of the human asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1983;258(18):11249-55.
- Schwartz AL, Steer CJ, Kempner ES. Functional size of the human asialoglycoprotein receptor as determined by radiation inactivation. *J Biol Chem* 1984;259:12025-9.
- Scully LJ, Toze C, Sengar DPS, Goldstein R. Early-onset auto-immune hepatitis is associated with a C4A gene deletion. *Gastroenterology* 1993;104:1487-84.
- Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells : more questions than more answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
- Siegmund W, Franke G, Biebler KE, Donner I, Kallwellis R, Kairies M, Scherber A, Huller H. The influence of the acetylator phenotype for the clinical use of dihydralazine. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1985;23 Suppl 1:S74-8.
- Simmonds MJ and Gough SCL. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *British Medical Bulletin* 2005;71:93-113.
- Sipes IG, Gandolfi AJ, Pohl LR, Krishna G, Brown BR Jr. Comparison of the biotransformation and hepatotoxicity of halothane and deuterated halothane. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214(3):716-20.
- Spiess M, Schwartz AL, Lodish HF. Sequence of human asialoglycoprotein receptor cDNA. An internal signal sequence for membrane insertion. *J Biol Chem* 1985;260(4):1979-82.
- Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: A model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* 1990;29:10009-22.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21: 139-76.
- Steinman R. Dendritic cells and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:2-96.
- Stockert RJ. The asialoglycoprotein receptor: Relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev* 1995;75:591-609.

- Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002;22(4):339-42.
- Stricker BH, Tijssen JG. Serum sickness-like reactions to cefaclor. *J Clin Epidemiol* 1992;45(10):1177-84.
- Stricker BH, van Kasteren BJ. Diclofenac-induced isolated myonecrosis and the Nicolau syndrome. *Ann Intern Med* 1992;117(12):1058.
- Surh C, Coppel R, Gershwin M. Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1990;144:3367-3374.
- Teitelbaum JE, Perez-Atayde AR, Cohen M, Bousvaros A, Jonas MM. Minocycline-related autoimmune hepatitis: case series and literature review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:1132-6.
- Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans Ch, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnik N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL. Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nature Med* 1996;2:1348-1353.
- Tilley BC, Alarcon GS, Heyse SP, Trentham DE, Neuner R, Kaplan DA, Clegg DO, Leisen JC, Buckley L, Cooper SM, Duncan H, Pillemer SR, Tuttleman M, Fowler SE. Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, double-blind, placebo-controlled trial. MIRA Trial Group. *Ann Intern Med* 1995;122:81-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- Treichel U, Gerken G, Rossol S, Rotthauwe HW, Meyer zum Büscherfelde, Poralla T. Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: Effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993;19: 55-63.
- Treichel U, McFarlane BM, Seki T, Krawitt EL, Alessi N, Stickel F, McFarlane IG, Kiyosawa K, Furuta S, Freni MA, et al. Demographics of anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994;107:799-804.
- Treichel U, Paietta E, Poralla T, Meyer zum Buschenfelde KH, Stockert RJ. Effects of cytokines on synthesis and function of the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Cell Physiol* 1994;158:527-34.
- Treichel U, Poralla T, Hess G, Manns M, Meyer zum Büschenfelde KH. Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. *Hepatology* 1990;11:606-12.

- Treichel U, Schreiter T, Meyer zum Büschenfelde KH, Stockert RJ. High-yield purification and characterization of human asialoglycoprotein receptor. *Prot Exp Purif* 1995;6:251-5.
- Van der Sluijs P, Braakman I, Meijer D, Groothuis G. Heterogeneous acinar localization of asialoglycoprotein internalization system in rat hepatocytes. *Hepatology* 1988;8:1521-1529.
- Van Pelt FN, Straub P, Manns MP. Molecular basis of drug-induced immunological liver injury. *Semin Liver Dis* 1995;15(3):283-300.
- Vergani D, Mieli-Vergani G, Alberti A, Neuberger J, Eddleston AL, Davis M, Williams R. Antibodies to the surface of halothane-altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothane-associated hepatitis. *N Engl J Med* 1980;303(2):66-71.
- Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002;35(8):485-92.
- Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Marceau G, Beland K, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity* 2004;37(3):217-22.
- Vogten AJ, Hadzic N, Shorter RG, Summerskill WH, Taylor WF. Cell-mediated cytotoxicity in chronic active liver disease: a new test system. *Gastroenterology* 1978;74:883-9.
- Waring JF, Anderson MG. Idiosyncratic toxicity: mechanistic insights gained from analysis of prior compounds. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2005;8(1):59-65.
- Waxman DJ, Lapenson DP, Krishnan M, Bernard O, Kreibich G, Alvarez F. Antibodies to liver/kidney microsome 1 in chronic active hepatitis recognize specific forms of hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 1988;95:1326-1331.
- Wen L, Peakman M, Lob Yeao A, et al. T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1990;336:1527-30.
- Wen L, Peakman M, Mowat AP, Mieli vergani G, Vergani D. $\gamma\delta^+$ T cell clones from liver biopsies of children with autoimmune chronic active (aCAH) and primary sclerosing cholangitis (aPSC) are cytotoxic to human liver target cells (abstract. *J Hepatol* 1991;13:S80.
- Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000;355:1510-5.
- Yamamoto A.M, Cresteil D, Boniface O, Clerc F.F and Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites

recognized by anti-liver-kidney microsome type 1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993;23:1105-1111.

- Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg J-C and Alvarez F. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and -negative sera. *Gastroenterology* 1993;104: 1762-1767
- Yamamoto AM, Mura C, De Lemos-Chiarandini C, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Cytochrome P45011D6 recognized by LKM1 antibody is not exposed on the surface of hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 1993;92:381-390.
- Yamamoto AM, Mura C, Morales MG, Bernard O, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Study of CYP2D6 gene in children with autoimmune hepatitis and P450IID6 autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:251-255.
- Yoshioka M, Mizuno M, Morisue Y, Shimada M, Hirai M, Nasu J, Okada H, Sakaguchi K, Yamamoto K, Tsuji T. Anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies, detected by a capture-immunoassay, are associated with autoimmune liver diseases. *Acta Med Okayama* 2002;56:99-105.
- Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, Homberg J-C, Meyer U. Antibodies against human cytochrome P450 db1 in autoimmune hepatitis type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1988;27:8256-8260.
- Zimmerman HJ, Lewis JH, Ishak KG, Maddrey WC. Ticrynafen-associated hepatic injury: analysis of 340 cases. *Hepatology* 1984;4(2):315-23.
- Zimmerman HJ. Drug-induced liver disease. *Drugs* 1978;16(1):25-45.
- Zimmerman HJ. Hepatotoxicity. *Dis Mon* 1993;39(10):675-787.